

Année 1967

N° d'ordre : 428

THÈSES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Maurice GABRIEL

PREMIERE THESE

Recherches sur la Physiologie du mycélium des Basidiomycètes en aérobiose et anaérobiose

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 17 Mars 1967, devant la Commission d'Examen.

MM. R. KÜHNER	Président
G. DUCET	} Examineurs
J. BOIDIN	

LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1967

Année 1967

N° d'ordre : 428

THÈSES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Maurice GABRIEL

PREMIERE THESE

Recherches sur la Physiologie du mycélium des Basidiomycètes en aérobiose et anaérobiose

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 17 Mars 1967, devant la Commission d'Examen.

MM. R KÜHNER	Président
G. DUCET	} Examineurs
J. BOIDIN	

LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1967

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, EYRAUD Henri,
DEJARDIN, VIRET, DUFAY Jean.

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. MESNARD
BOIDIN

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie générale II
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
BOIDIN	Microbiologie et mycologie
PERES	Physiologie
MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
DREUX	Chimie organique

MM.	TEICHNER	Chimie industrielle
	PAVANS de CECCATTY	Zoologie
	MERLIN	Chimie analytique
	DUFAY Maurice	Physique de l'atmosphère
	PHILBERT	Physique nucléaire
	COHEN-ADAD	Chimie
	DAVID Louis	Géologie générale
	CHANEL	Psychophysiologie
	MAURY	Méthodes mathématiques de la physique
	DEPRAZ	Physique nucléaire
	GAUTHIER Jean	Chimie
	GAUME	Physique expérimentale
	UZAN	Physique
	LEGAY	Biologie animale
	LAFORGUE	Physique
	GERMAIN	Chimie

Professeurs sans chaire

	FERON	Mathématiques
	CHENEVOY	Géologie appliquée
	GINET	Zoologie
	ASCH	Physique
	MICHEL Pierre	Minéralogie
Mle	MAITROT	Physique
	GEVIN	Géologie générale
	PONASSE	Mathématiques
	d'INCAN	Physique C.S.U.
	LEFEBVRE	Mathématiques
	PERNET	Mathématiques
	CHERY	Physique
	BERGEON	Physique C.S.U.
Mle	GAUTHERON	Chimie biologique
	DESCOTES	Chimie organique
	ERBEIA	Physique
Mme	ERICSON	Physique générale
	LEMOIGNE	Botanique
	MARTEL	Mécanique
	MATHIEU	Mécanique des fluides
	MICHEL Georges	Biochimie

Maîtres de Conférences

MM.	PICARD Philippe	Mathématiques
	DEMARCO	Géologie générale
	LEBRETON	Biologie végétale
	DAVID Jean	Biologie animale
	TOUSSET	Chimie propédeutique
	FEUVRAIS	Physique-Electricité
	SCHMITT	Physique C.P.E.M.
	LAURENT	Chimie organique
	ROT	Mathématiques
	BETHOUX	Mathématiques T.M.P.
Mle	CALAIS	Mathématiques

MM.	GUSAKOW	Physique
Mle	THOMAS	Chimie minérale
	AUBIN	Analyse numérique
	BUCHWALTER	Mathématiques
	BOUZON	Mathématiques C.S.U.
	COSNIER	Psychophysiologie
Mle	LAMOURE	Biologie végétale
	PORTHAULT	Chimie C.S.U.
	VALLET	Chimie macromoléculaire
	HAUGAZEAU	Analyse numérique
	ENAY	Géologie
	BERTHET	Biologie végétale C.P.E.M.
	BRUN	Biologie animale
	DELMAU	Physique
	EL BAZ	Physique-Electricité
	FONTANGES	Physiologie
	HUET	Chimie C.P.E.M.

Maître de Conférences adjoint

M.	PIERRON	Chimie
----	---------	--------

Conseiller Administratif

M.	BURNET
----	--------

Secrétaire Principal honoraire

M.	ROUX
----	------



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552601_0024

M. le Professeur KUHNER, Membre de l'Institut, nous fait l'honneur de présider notre Jury. Après nous avoir accueilli dans son service, il nous a orienté vers le passionnant domaine de la Physiologie des champignons, nous inspirant le présent sujet. Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de notre respectueuse et vive gratitude.

M. le Professeur DUCET, de la Faculté des Sciences de MARSEILLE, a bien voulu venir juger notre travail. Lors de son séjour à la Faculté des Sciences de LYON, il nous a conseillé avec une bienveillance qu'il nous est agréable de souligner, nous faisant profiter de sa grande expérience et partager son enthousiasme pour la Physiologie végétale. Nous lui sommes profondément reconnaissant et lui exprimons notre respectueuse admiration.

M. Le Professeur BOIDIN nous a fait bénéficier à maintes occasions, de ses conseils et de ses critiques. Il nous a éclairé sur des particularités biologiques des Corticiés, dont il est un éminent spécialiste, nous guidant dans le choix des espèces les plus intéressantes et mettant à notre disposition de nombreuses souches. Nous lui exprimons ici, notre profonde reconnaissance.

Nous remercions vivement tous nos collègues et camarades de laboratoire, le personnel technique, dont l'aide et la sympathie nous furent fort précieuses.

I N T R O D U C T I O N

D'une façon générale, les recherches physiologiques sur les champignons filamenteux n'ont jamais atteint l'ampleur et la précision de celles effectuées sur les levures, malgré le regain d'intérêt suscité par la découverte des antibiotiques. Cela tient pour une grande part à ce que les levures constituent, pour le physiologiste, un matériel expérimental homogène, et offrent un champ d'investigations commode. Cependant, la culture des mycéliums, si elle est effectuée en milieu liquide, n'est pas sans présenter des avantages similaires. Elle permet de standardiser au mieux les conditions des expériences, et d'isoler aisément, et les produits du métabolisme, et l'organisme responsable. Enfin ce dernier, dans la mesure où il croît en totalité au sein du milieu nutritif, constitue pour l'expérimentateur un matériel assez homogène.

Un tel mode de culture, qui facilite la tâche du physiologiste, n'est pas éloigné de certaines conditions naturelles. Nous ferons remarquer, à ce propos, que dans toute culture sur milieu solide, une fraction plus ou moins importante du mycélium se trouve, en fait, immergée, et que, dans la nature, beaucoup d'espèces se propagent à l'intérieur d'un support compact, donc peu aéré, ou dans des sols humides.

Nos connaissances sur la Physiologie des Basidiomycètes concernent essentiellement la nutrition. Nous ne savons pratiquement rien de la cinétique de la croissance, de l'intensité des échanges gazeux, éléments pourtant indispensables pour contrôler l'activité et la nature du métabolisme et envisager des recherches précises. C'est pour combler cette lacune que nous avons entrepris ce travail. Certains des problèmes posés ne sont d'ailleurs pas particuliers aux Basidiomycètes et

peuvent intéresser l'ensemble des champignons filamenteux.

D'autre part, la culture en milieu liquide entraîne, pour divers Basidiomycètes, des modifications importantes du mycélium. Il nous a paru nécessaire de nous attarder quelque peu sur cette action du milieu environnant et d'en préciser la cause.

Nous traitons en premier lieu la question de la croissance : cinétique, taux et rendement, ainsi que celles des modifications du mycélium. Nous étudions ensuite le métabolisme fermentaire de quelques espèces capables de croître en anaérobiose. Puis notre exposé est consacré au métabolisme aérobie : intensité de la respiration et de la fermentation aérobie, variations en fonction de certaines conditions expérimentales, mise en évidence d'un phénomène d'adaptation respiratoire. Enfin nous rapportons, dans un dernier chapitre, nos observations sur le métabolisme endogène.

L'historique de chacune des questions abordées est exposé dans l'introduction du chapitre correspondant.

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

1. ORIGINE ET CHOIX DES ESPECES

Nous avons utilisé des souches diploïdes provenant de la mycothèque du laboratoire (°). Il s'agit, pour la plupart des espèces, de Corticiés ; celles-ci, d'une façon assez générale, sont capables de croître rapidement en culture liquide.

Les expériences principales sont réalisées avec Phlebia radiata Fr. souche 221 et Corticium ochraceo-fulvum (B. et G.) Wakef, souche 441. Pour les recherches sur le métabolisme aérobie du glucose, nous avons eu recours également à Peniophora crenea (Bres.) Sacc. et Syd., souche 375, qui, à la différence des deux autres, est dépourvue d'aptitude fermentaire. Les caractères mycéliens de ces espèces ont été décrits par BOIDIN (1954).

Certaines expérimentations, en particulier celles concernant les modifications du mycélium en milieu submergé, sont effectuées avec Merulius rufus Pers. souche 4.160, Merulius tremellosus (Schrad.) Fr. souche 452, Phlebia radiata Fr. souche 3062, Corticium ochraceo-fulvum (B. et G.) Wakef souche 1990. Pour ces deux dernières espèces, nous avons dû en effet recourir à des souches plus récentes, les précédentes présentant des caractères de néo-haplonte. Nous préciserons alors en cours d'exposé, et dans ce cas seulement, le n° de la souche.

(°) Laboratoire de Microbiologie et Mycologie de la Faculté des Sciences de Lyon. Les Agaricales proviennent de la collection du Professeur R. KUHNER ; les Corticiés, de la collection du Professeur J. BOIDIN.

Parmi les Agaricales, une espèce entre autres a retenu notre attention car elle a, en milieu submergé, un métabolisme relativement actif. Il s'agit de Panellus serotinus (Fr. ex Schrad.) Kühn., souche récoltée et étudiée par KÜHNER (1950 et viva voce).

La liste complète des espèces utilisées dans ce travail figure dans le tableau V.

2. METHODES DE CULTURE

2.1. TECHNIQUES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les souches sont conservées sur milieu solide gélosé à $4^{\circ} \pm 1$. Il est d'abord procédé à un repiquage sur même milieu gélosé, puis à une première culture en milieu liquide ; celle-ci est utilisée au cours de son développement pour ensemen- cer les cultures servant aux expériences.

L'ensemencement est effectué par bouturage d'un très petit fragment de mycélium prélevé à la marge de la culture. Nous avons également eu recours, dans l'étude de la croissance, à des ensemencements par mycélium homogénéisé et par arthrospores ; quel que soit le mode d'ensemencement, les caractéristiques de la croissance sont les mêmes, nous avons donc donné la préférence à la technique du bouturage, plus commode. D'autre part, l'homogénéisation s'est révélée traumatisante. De plus elle ne permet pas d'obtenir, tout au moins pour les espèces auxquelles nous avons eu à faire, une culture agitée du "type suspension", ce qui aurait l'avantage de normaliser les conditions d'aération. Il se produit, comme pour l'ensemencement par bouture, un développement mycélien en une ou quelques masses plus ou moins denses.

Précultures et cultures sont réalisées dans les mêmes conditions. Le milieu nutritif est le même. L'incubation a lieu à l'obscurité à 25° . Sauf indication, les cultures ne sont pas agitées ; l'aération est obtenue par la faible épaisseur de la couche liquide ; ces conditions d'aération sont discutées dans les chapitres 2 (§ 2.1.1) et 4 (§ 2.5.1).

2.2. MILIEU DE CULTURE

C'est le milieu synthétique de WICKERHAM (1951). Sa composition par litre est la suivante :

PO_4KH_2	1 g	asparagine.....	1,5 g
$\text{Mg SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g	histidine.....	0,01 g
NaCl	0,1 g	DL méthionine.....	0,02 g
$\text{CaCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,1 g	DL tryptophane.....	0,02 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{ SO}_4$	3,5 g		

A cela s'ajoutent des vitamines et des oligo-éléments apportés par différents sels, soit en μg par litre :

biotine.....	2	H_3BO_3	500
pantothénate de calcium.....	400	$\text{Cu SO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$	40
acide folique.....	2	IK.....	100
inositol.....	2000	$\text{Fe Cl}_3, 6 \text{ H}_2\text{O}$	200
niacine.....	400	$\text{Mn SO}_4, 1 \text{ H}_2\text{O}$	400
acide para aminobenzoïque.....	200	$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2 \text{ H}_2\text{O}$	200
chlorhydrate de pyridoxine.....	400	$\text{Zn SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	400
riboflavine.....	200		
chlorhydrate de thiamine.....	400		

La source d'hydrates de carbone est constituée par 20 g de glucose.

Nous stérilisons séparément par autoclavage à 110° , pendant une demi-heure, les solutions de :

- 1) sels de base + amino-acides
- 2) vitamines
- 3) éléments-traces
- 4) glucose.

Le pH du milieu complet, après stérilisation, est de 4,7. On sait qu'un pH légèrement acide est favorable à la croissance des Hyménomycètes lignivores. Nous avons cependant procédé, pour Phlebia radiata et Corticium ochraceo-fulvum, à des essais préliminaires de croissance à des pH différents : 4,7, 3,2 et 7. Ces deux derniers sont obtenus en remplaçant, dans le milieu de WICKERHAM, PO_4KH_2 par une quantité convenable de $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ ou de PO_4H_3 . La teneur en P reste la même ; celle du K est égalisée en ajoutant, dans les 3 milieux, plus ou moins de K Cl.

	<u>Phlebia radiata</u>			<u>Corticium ochraceo-fulvum</u>		
	3,2	4,7	7	3,2	4,7	7
Poids secs des cultures en mg	19,1	48,2	6,3	19,9	24,7	1,1
	20,6	40,2	4,6	17	21,6	0,7
	18,3	34,5	2,6	16,8	20,5	0,5
	16,8	29,3	2,4	16,6	19,2	0,5
	14,2	21,4	2,4	14,6	18,2	0,4
	11,8	19,3	2,2	12,2	18,1	0,4
Poids secs moyens	16,8	32,1	3,4	16,2	20,4	0,6

3. TECHNIQUES D'ANALYSE

3.1. ANALYSE DES PRODUITS DU MILIEU

3.1.1. Acides organiques fixes solubles dans l'eau.

Extraction : après essais avec des solutions témoins, nous avons préféré, à l'emploi des échangeurs d'ions, la technique d'extraction en continu par l'éther.

50 cm³ de milieu filtré sont acidifiés par 20 cm³ de H₂SO₄ normal et extraits par 500 cm³ d'éther (sans peroxyde) pendant 36 à 40 heures. L'éther est ensuite "séché" avec Na₂SO₄, ce qui élimine les acides minéraux (CONWAY et BRADY 1950), puis évaporé à 30°. Le résidu est repris dans 1 cm³ d'eau chaude.

Analyse chromatographique : nous avons utilisé les solvants de séparation préconisés par CHEFTEL et al. (1951 et 1952), et la technique de révélation de CARLES et al. (1958).

Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas d'adsorption des acides organiques sur le Na₂SO₄.

Dosage : les acides fixes extraits sont dosés globalement par de la soude $\frac{N}{20}$ préparée à partir d'une solution commerciale $\frac{N}{10}$.

3.1.2. Acides volatils

Pour l'extraction, l'analyse chromatographique et le dosage global, nous avons suivi la technique exposée en détails par GUILLAUME et al. (1956). L'entraînement à la vapeur est appliqué à 20 cm³ de milieu de culture. Le dosage est effectué avec de la soude $\frac{N}{100}$ préparée et contrôlée au moment de l'emploi.

3.1.3. Alcools volatils

Extraction : 20 cm³ de milieu de culture sont soumis à une double distillation dans les conditions décrites par FRIEDMANN (1937).

Analyse chromatographique : les alcools sont d'abord transformés en xanthates, puis chromatographiés (KARIYONE et al. 1951).

Dosage : il est effectué selon la méthode de NICLOUX (1931).

3.1.4. Glycérol

Nous l'avons recherché par analyse chromatographique, soit sous forme libre, soit sous forme d'ester phosphorique.

3.2. DOSAGE DU GLUCOSE

Le glucose non utilisé est dosé par photolorimétrie, après réaction avec l'anthrone, en milieu sulfurique (KOEHLER 1952). Il faut veiller au mélange complet de la solution contenant le glucose avec le réactif. Ces essais sont placés au bain-marie à 80° durant 9 minutes comptées à partir du mélange, puis refroidis à l'eau glacée avant la mesure. Photolorimètre type "Lumetron", filtre 650 m μ .

3.3. MICRODOSAGE DE L'AZOTE DU MYCELIUM

Nous procédons selon la technique exposée par GRABAR (in LOISELEUR 1954).

3.4. MESURE DU POIDS DES MYCELIUMS

Après expérimentation, les mycéliums sont rincés soigneusement à

l'eau distillée et séchés pendant 1 heure à 110°.

Les pesées sont effectuées soit avec une balance de torsion pesant dans l'intervalle de 0 à 1 mg, et jusqu'à 2 mg avec l'emploi d'une tare, (sensibilité $\frac{2}{100}$ mg), soit avec une balance monoplateau (sensibilité $\frac{2 \text{ mg}}{100}$).

4. TECHNIQUES MANOMETRIQUES

La mesure des échanges gazeux est faite selon la méthode de WARBURG, (voir DIXON 1951, UMBREIT et al. 1957).

L'appareil est du type BRAUN, S. 85. Les fioles utilisées ont une capacité moyenne de 13 cm³. La vitesse d'agitation a été fixée, après essais, à 160 oscillations complètes par minute, amplitude de 2 cm. La température est de 25°. Le volume liquide par fiole est de 2 cm³ ; à ce volume s'ajoute, pour les mesures de respiration, 0,2 cm³ de K OH à 20 %. La vitesse d'absorption du CO₂ est augmentée par un rectangle plissé de papier filtre, (papier à chromatographie, dimensions 1,2/2,5 cm).

Le CO₂ dégagé en atmosphère ordinaire est mesuré par la méthode directe de WARBURG, sans faire de correction pour la rétention par le milieu, ce dernier étant à pH 4,7.

Sauf indication, le milieu de suspension est celui de WICKERHAM. Après essorage rapide, un seul mycélium est introduit par fiole.

Au cours des manipulations, des précautions sont prises pour éviter les contaminations : par exemple, les fioles séjournent au moins 14 heures à l'étuve à 80°; après leur rinçage le milieu nutritif est introduit à la pipette PASTEUR, etc...

Nous avons vérifié que dans nos conditions d'expérimentation, la vitesse des échanges gazeux, (absorption d'O₂, rejet de CO₂), n'est pas limitée par la vitesse de diffusion de ces gaz dans le milieu de suspension. Les volumes échangés par heure sont progressivement accrus en augmentant la quantité de mycélium introduite par fiole. Dans l'intervalle de poids sec de 0,3 à 6 mg, la relation entre le volume d'oxygène absorbé ou de CO₂ dégagé et la quantité de mycélium, est linéaire, comme en témoigne la figure 1.

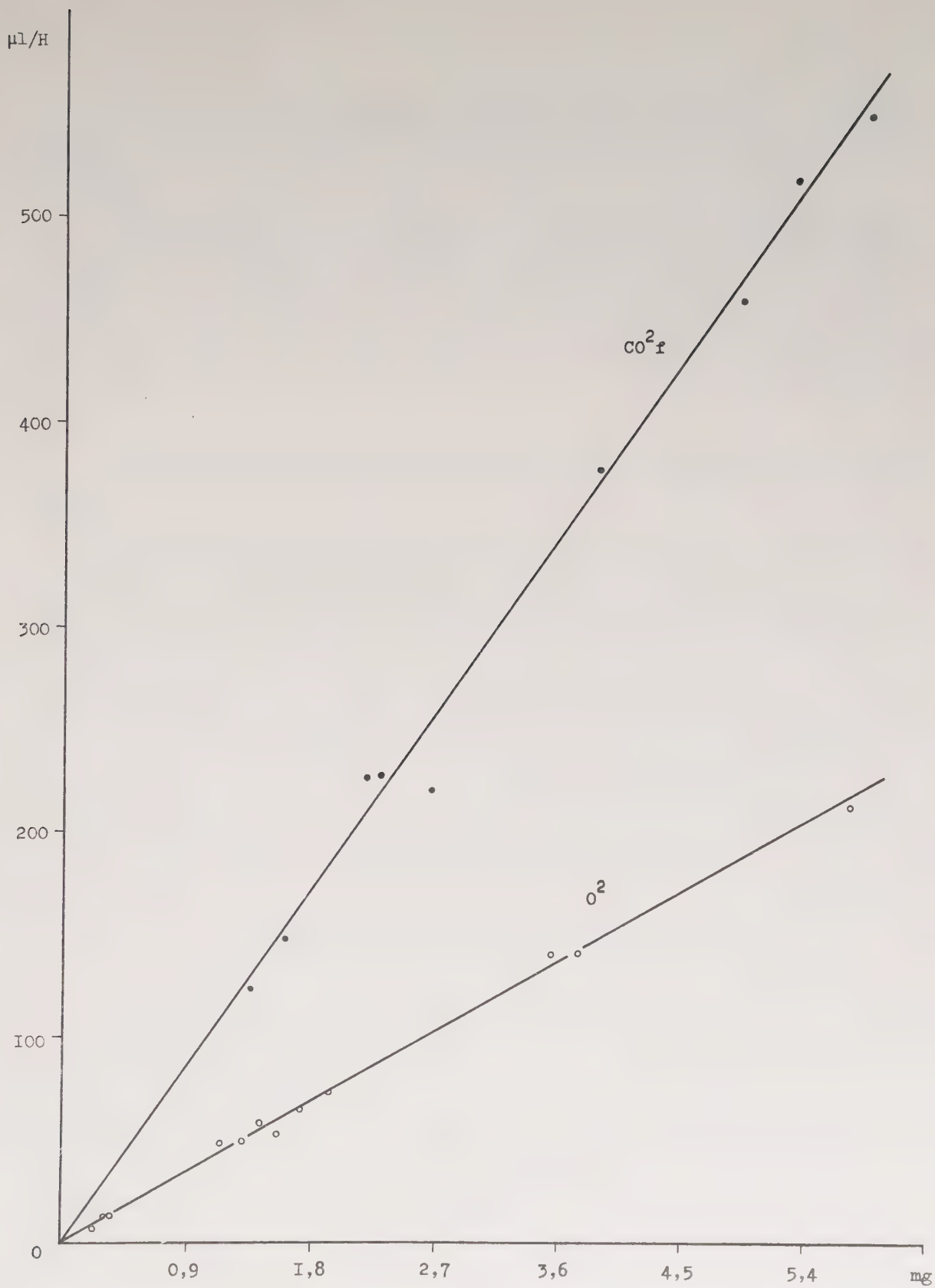


Fig.I VITESSE DES ECHANGES GAZEUX EN FONCTION DE LA QUANTITE DE MYCELIMUM

Les volumes gazeux pouvant diffuser dans le milieu de suspension dépassent 280 μ l/heure pour l'oxygène, et 580 μ l/heure pour le gaz carbonique.

Ces expériences préliminaires sont faites avec Phlebia radiata. Pour éviter l'influence de facteurs tels que âge, densité du mycélium, l'augmentation de poids est obtenue en plaçant par fiole 1, 2 ou 3 mycéliums provenant d'une même série de cultures. Le rejet du gaz carbonique est mesuré en atmosphère d'azote, car il est alors beaucoup plus actif.

Les volumes gazeux sont exprimés conventionnellement de la façon suivante :

QO_2 = nombre de μ l d' O_2 absorbé par heure et par mg de poids sec sous atmosphère ordinaire ; exprime l'intensité respiratoire.

QCO_2 = nombre de μ l de CO_2 rejeté par heure et par mg de poids sec sous atmosphère ordinaire.

$QCO_2 f$ = nombre de μ l de CO_2 rejeté par heure et par mg de poids sec sous atmosphère ordinaire et résultant d'un métabolisme fermentaire ;

$Q CO_2 f = Q CO_2 - QO_2$; exprime l'intensité fermentaire aérobie.

$Q_{CO_2}^{N_2}$ = nombre de μ l de CO_2 rejeté par heure et par mg de poids sec sous atmosphère d'azote ; exprime l'intensité fermentaire.

5. REALISATION DE MELANGES GAZEUX

Le débit de chacun des gaz constituant le mélange, à travers un capillaire de dimension donnée et sous une pression fixe, (tube en T plongeant dans une éprouvette d'eau), est mesuré par le déplacement horizontal de très fines bulles dans une pipette précise graduée du $\frac{1}{10}$ de cm^3 . Ces bulles résultent de l'émulsion d'un détergent. Le débit est ajusté à la valeur désirée en réglant la pression du gaz et les dimensions du capillaire (diamètre et longueur).

Le gaz carbonique utilisé provient de "La Carbonique Française" et l'azote de la "Société l'Air Liquide" ; il s'agit d'azote "R" dont la teneur en oxygène n'excède pas 0,005 %.

(o) Il s'agit de cultures non agitées.

C H A P I T R E I I

R E C H E R C H E S S U R L A C R O I S S A N C E

1. I N T R O D U C T I O N

La croissance du mycélium de divers Basidiomycètes au sein d'un milieu nutritif liquide a vraisemblablement été observée depuis longtemps, mais la réalisation en série de cultures submergées, soit par une agitation des récipients, soit par un développement naturel du mycélium dans la profondeur du liquide, n'a commencé qu'en 1948. HUMFELD (1948), obtient ainsi la croissance de Agaricus campestris ; JENNISON (1948), celle de diverses espèces lignivores. SUGIHARA et HUMFELD (1954), cultivent de cette façon 19 espèces de Basidiomycètes, pour la plupart des Agaricales. ODDOUX (1955), recherchant les exigences alimentaires des Homobasidiés à recours aux cultures submergées pour une soixantaine d'espèces, Agaricales et Aphylllophorales. JENNISON et al. (1955) utilisent ce mode de culture pour une étude comparative de la croissance et de la nutrition de 42 espèces communes provoquant des pourritures brunes et blanches. Nous ne citons que les principaux travaux relatifs à la croissance en milieu submergé, ils montrent amplement que de nombreux Basidiomycètes sont capables de croître dans ces conditions.

Mais toutes ces recherches sont essentiellement consacrées aux exigences nutritives. Par contre, il n'existe aucune étude quantitative qui permette, pour une espèce donnée, de définir avec précision la cinétique et la vitesse de la croissance. A notre connaissance, pour l'ensemble des champignons filamenteux, il n'a été procédé qu'à une seule analyse détaillée de la cinétique de la croissance, ceci par

EMERSON (1950) à propos de l'Ascomycète Neurospora crassa. A l'issue de cette étude, faite avec des cultures submergées non agitées, EMERSON a conclu à une croissance de type linéaire. Cette conclusion est aussi celle des auteurs qui, sans procéder comme EMERSON à une analyse discutée de la cinétique, ont cependant effectué des mesures de croissance de divers Fungi Imperfecti, (COCHRANE 1958). Nous nous proposons de revenir sur ce point au cours de la discussion de nos résultats.

Si les données relatives à la cinétique et à la vitesse de la croissance font défaut, celles concernant le rendement sont assez nombreuses. Les auteurs cités plus haut ont noté le poids du mycélium à la fin de la croissance, si on admet que l'arrêt de la croissance est le plus souvent déterminé par l'épuisement du substrat, le poids de ce dernier étant donné, on est en possession des rendements réels de croissance. Les résultats varient selon les auteurs. D'après SUGIHARA et HUMFELD (1954), les rendements sont souvent de 40 à 50 %, ils atteignent parfois 60 %. Pour JENNISON (1955), ils sont nettement plus faibles ; les croissances les plus fortes obtenues par ce dernier sont de 130 à 160 mg pour 700 mg de glucose ce qui donne des rendements de 18 à 23 %.

Cette aptitude à pousser en milieu submergé, parfois profond, peut être l'indice d'une aptitude à croître en anaérobiose. BAVENDAMM (1928) a procédé à des cultures sur gélose sous une pression d'air réduite, pour 32 espèces lignivores dont 27 Basidiomycètes. La croissance paraît devoir être ralentie pour des diminutions de pression relativement modérées, (essais à des pressions d'air de 76, 55, 47 mm de Hg). BAVENDAMM ne constate aucune pousse pour des essais effectués sous une pression d'air de 20 mm, soit donc 4 mm d'oxygène.

D'autres auteurs ont cependant obtenu une croissance à des teneurs en oxygène bien plus faibles, sur des espèces, il est vrai, non testées par BAVENDAMM. Ainsi, d'après SCHEFFER et LIVINGSTONE (1937), Polystictus versicolor garde une croissance presque normale, sur milieu gélosé, à une pression d'oxygène de 10 mm de Hg ; en dessous de 10 mm la croissance est très sensible à la pression de l'oxygène, mais elle n'est arrêtée qu'à une pression inférieure à 1,5 mm. GUNDERSEN (1961) a montré

que si Fomes annosus est incapable de pousser en absence totale d'oxygène, sa croissance reste cependant normale, sur gélose, en atmosphère très raréfiée, (la pression théorique de l'oxygène est 0,02 mm, mais l'auteur signale la possibilité d'une teneur plus importante en oxygène dans la gélose).

Enfin, NORD et SCIARINI (1946) notent incidemment que certains destructeurs de bois, tels Merulius niveus et Merulius tremellosus peuvent croître en atmosphère d'azote ; il en est de même, mais à un degré moindre, pour Merulius confluens et Fomes annosus.

Il nous a semblé nécessaire de reprendre ce problème de la croissance à basse pression d'oxygène et en anaérobiose.

°
° °

La croissance en milieu submergé peut être la cause, chez les Basidiomycètes, de modifications morphologiques importantes qui affectent des caractères en relation avec le cycle sexuel du champignon. Elles concernent les boucles et le nombre de noyaux par article.

Les premières observations à ce sujet sont dues à KNIEP (1918) qui note, à propos de diverses espèces, que les hyphes développées dans la gélose ou au sein d'un milieu nutritif liquide sont dépourvues de boucles alors que les hyphes aériennes sont régulièrement bouclées.

KÜHNER et YEN (1947) font la même constatation avec Merulius rufus Pers. et précisent que la réapparition des boucles, dans une culture aérienne issue d'hyphes submergées, demande un certain temps. KÜHNER (1950) signale que plusieurs Homobasidiés, (en majorité des Agaricales), se comportent de cette façon et que certaines de ces espèces, repiquées sous collodion, conservent encore des hyphes non bouclées et présentent des articles terminaux qui sont cénocytiques au lieu d'être uninucléés. En particulier, Panellus serotinus "produit un mycélium aérien tout bouclé, mais s'étend sur gélose ou sous collodion par hyphes rayonnantes, à cloisons rares, non bouclées, multinucléées".

BOIDIN (1954) procède à des observations similaires pour un

certain nombre de Corticiés. Il remarque l'influence de l'immersion plus ou moins profonde et note que les boucles devenues inconstantes "par suite des conditions extérieures intermédiaires", "se localisent sur les hyphes étroites". Etudiant d'autre part le comportement nucléaire et ses variantes chez les Corticiés, BOIDIN (1954) montre que pour certaines espèces, les articles du diplonte, normalement binucléés à l'air, sont cénocytiques comme ceux de l'haplonte si le mycélium s'est développé en profondeur. Le mycélium submergé secondaire est, de plus, dépourvu de boucle. Il reprend donc toutes les apparences du mycélium primaire.

Chez ces espèces, le comportement nucléaire et la répartition des boucles sur le mycélium polysperme apparaissent ainsi être sous la dépendance d'un même facteur externe.

Cette sensibilité au milieu externe, et ce comportement nucléaire particulier, dit astatocénocytique, caractérise un ensemble homogène de Corticiés, ensemble comprenant surtout les genres Phlebia emend. DONK, Mycoacia... (BOIDIN 1964).

KNIEP (1918), essaye d'expliquer l'absence des boucles en milieu submergé. Constatant que pour Clitocybe expallens, les hyphes très peu immergées en sont quand même dépourvues, il rejette l'hypothèse "d'un manque d'oxygène". Il attribue aux boucles un rôle dans la circulation des substances nutritives dans les articles aériens du mycélium. Quand les hyphes croissent en profondeur, donc directement en contact avec le milieu, les boucles devenues inutiles ne se forment plus.

BOIDIN (1954) choisit 6 espèces dont le mycélium secondaire aérien est régulièrement bouclé, mais dont le mycélium immergé est dépourvu de boucles. Les espèces choisies ne produisent pas d'oïdies haploïdes qui provoqueraient l'apparition de mycélium primaire cénocytique à croissance très active.

Il utilise un dispositif particulier d'agitation en milieu liquide, afin d'obtenir une bonne aération sans supprimer le contact avec la solution nutritive. Il constate que les mycéliums ayant ainsi poussé en milieu submergé sont bouclés, et que les mycéliums dépourvus de boucles par culture profonde, les reprennent dans ces conditions. Il conclut que

le facteur responsable de la perte des boucles n'est pas le facteur nutritif retenu par KNIEP mais que le mycélium réagit aux conditions d'aération.

Il importait, dans des recherches d'ordre physiologique, de préciser ce rôle de l'aération.

2. ETUDE QUANTITATIVE DE LA CROISSANCE EN AEROBIOSE

2.1. CONDITIONS D'EXPERIMENTATION

Nous avons analysé la cinétique de la croissance de Phlebia radiata et déterminé, pour cette espèce, les constantes de croissance, vitesse et rendement.

2.1.1. Aération des cultures

Il est évidemment souhaitable, pour une telle étude, qu'aucun facteur autre que celui étudié le cas échéant, ne vienne limiter la croissance. Ceci est pratiquement impossible à réaliser dans les cultures en volume défini où l'accumulation des produits du métabolisme peut perturber la croissance. Mais surtout, dans le cas des champignons filamenteux, les conditions d'aération du mycélium paraissent être difficilement constantes. En effet, l'aération est obtenue par agitation mécanique, ou insufflation d'air ou d'oxygène, ou les deux simultanément ; or, nous avons constaté dans tous les cas, que le mouvement des couches liquides provoquait une croissance plus compacte du mycélium, allant, pour certaines espèces, jusqu'à la formation de boulettes ou grains mycéliens ayant la densité d'un tissu. Nous verrons ultérieurement, dans le chapitre IV, qu'une telle compacité du mycélium constitue une barrière pour la diffusion de l'oxygène, et que toute agitation, même modérée, risque le plus souvent d'aboutir à l'inverse de l'effet recherché.

Pour ces raisons, les cultures ne sont ni agitées, ni soumises à une insufflation d'air ; l'aération est facilitée par la faible épaisseur du milieu nutritif liquide. Cette épaisseur n'est que de 1 cm pour une surface de 12 cm², (fioles coniques de 100 cm³ ne contenant que 15 cm³ de milieu).

2.1.2. Mesure de la croissance

Il est classique, pour les organismes unicellulaires, de suivre la croissance par des comptages de cellules ou par néphélométrie, la

densité optique d'une suspension d'unicellulaires variant, dans certaines limites, comme le nombre de cellules, ou le poids global des organismes. Nous avons constaté, après essais, que les mesures de densité optique ne permettaient d'apprécier la croissance d'un mycélium que de façon peu précise, et cela, dans des limites de poids très restreintes. Nous avons donc suivi la croissance pondéralement, ce qui implique de procéder à un grand nombre de cultures afin d'avoir, pour une durée donnée de croissance, un poids moyen significatif. Chaque poids est la moyenne de 6 ou 7 cultures.

Les pesées sont effectuées après des périodes de croissance relativement brèves, de 16 à 24 H, sauf en fin de croissance où elles peuvent être de 48 H.

Si nécessaire, le mycélium est prélevé après centrifugation.

2.1.3. Ensemencement

Nous avons comparé les résultats donnés par trois modes différents d'ensemencement : par boutures, par mycélium homogénéisé et par arthrospores. Boutures et mycélium homogénéisé proviennent de précultures en milieu liquide, âgées de 1 semaine environ et dont la croissance n'est pas terminée.

L'homogénéisation est réalisée avec un mixeur tournant à vitesse modérée. Environ 80 mg de mycélium (poids sec) sont homogénéisés dans 20 cm³ de milieu nutritif refroidi ; après filtration sur gaze, le volume est amené à 80 cm³ ; $\frac{1}{2}$ cm³ de la suspension est inoculé par elernmeyer.

Les arthrospores proviennent de culture sur gélose ; chacune de ces cultures, d'une surface de 12 cm² environ est agitée avec 20 cm³ de milieu nutritif qui sont ensuite filtrés sur gaze. L'ensemencement de chaque flacon à culture est effectué par $\frac{1}{2}$ cm³ de ce milieu. La concentration des arthrospores est en moyenne de 1750 par mm³, (numération à la cellule de Thoma).

2.2. CINETIQUE DE LA CROISSANCE

2.2.1. Résultats

Ils sont récapitulés dans les tableaux I, II, III.

TABLEAU I - Cinétique de la croissance de Phlebia radiata

Ensemencement par boutures

Durée de la crois- sance en heures	Poids sec des mycéliums en mg							Poids moyen	$\sqrt[3]{P}$
25	0,09	0,11	0,13	0,15	0,21	0,24	0,26	0,17	0,55
48	0,63	0,83	1,03	1,15	1,37	1,41	1,45	1,12	1,03
72	1,66	2,13	2,26	3,00	3,50	4,18	4,65	3,05	1,44
96	6,90	12,36	17,72	17,75	19,90	21,78	25,62	17,43	2,59
135	23,50	26,25	31,10	35,20	35,75	36,30	36,40	32,07	3,17
168	37,60	37,90	41,60	42,30	43,40	44,90	45,40	41,87	3,47
207	40,10	43,00	46,90	49,20	51,90	52,20	53,70	48,14	3,63
255	43,60	50,30	50,70	52,00	55,20	56,40	56,80	52,14	3,73

Tableau II - Cinétique de la croissance de Phlebia radiata
Ensemencement par mycélium homogénéisé

Durée de la crois- sance en heures	Poids sec des mycéliums en mg							Poids moyen	$\sqrt[3]{P}$
48	0,20	0,22	0,22	0,23	0,24	0,26	0,26	0,23	0,61
63	0,47	0,63	0,38	0,57	0,56	0,59	0,76	0,56	0,82
71	1,43	1,47	1,53	1,57	0,87	1,71	1,78	1,48	1,14
87	2,60	3,20	3,30	3,35	4,00	4,20	4,30	3,56	1,52
111	14	15,30	16,30	16,35	16,40	17,05	19,15	16,36	2,54
135	11,85	13,00	13,10	24,35	28,40	28,85	37,60	22,45	2,81
159	20,50	26,10	30,15	31,25	34,75	35,00	41,05	31,25	3,14
183	28,50	30,35	33,25	34,15	41,65	62,60	59,45	38,56	3,37
207	37,65	39,30	41,30	43,65	44,00	53,40	54,15	44,83	3,55
231	46,25	50,70	54,50	56,75	58,40	59,00	60,25	55,12	3,80
303	53,15	53,70	54,75	54,95	58,50	58,80	61,00	56,40	3,83
327	52,00	54,10	54,15	58,25	58,75	58,80	59,00	56,62	3,83

Tableau III - Cinétique de la croissance de Phlebia radiata
Ensemencement par arthrospores

Durée de la crois- sance en heures	Poids sec des mycéliums en mg							Poids moyen	$\sqrt[3]{P}$
72	0,58	0,65	0,73	0,85	1,02	1,05	1,18	0,87	0,95
84	1,67	1,69	1,71	1,77	2,02	2,07	2,13	1,86	1,23
95	4,35	4,65	4,65	4,70	5,10	5,10	5,20	4,82	1,69
105	5,90	7,25	7,30	8,00	8,60	8,75	9,20	7,85	1,99
119	11,90	12,65	13,85	15,95	16,85	17,80	18,00	15,42	2,49
129	11,35	16,00	16,45	18,40	20,00	21,15	23,45	18,11	2,62
143	18,85	20,65	22,40	24,80	25,10	25,45	26,85	23,45	2,86
165	26,90	27,30	27,60	28,75	28,95	31,70	39,60	30,10	3,11
191	25,80	26,00	26,50	28,40	29,20	30,60	45,95	30,25	3,11
215	27,80	28,25	29,00	29,60	30,00	34,50	58,90	34,00	3,24
263	37,80	37,90	41,00	41,00	41,15	47,10	54,60	42,93	3,50
287	46,00	46,25	46,55	47,90	48,10	50,20	50,95	47,99	3,63
311	43,20	43,70	44,00	46,30	46,80	51,30	54,35	47,06	3,61
335	40,25	44,00	45,15	49,20	49,80	50,60	53,65	47,52	3,62
359	51,00	46,60	39,20	56,30				48,26	3,64

Les 3 modes d'ensemencement donnent des courbes de croissance, poids en fonction du temps, qui sont similaires et d'allure classique (fig. 2). Ces courbes mettent en évidence une phase de croissance active, où le poids semble d'abord varier de façon exponentielle, la variation devenant ensuite très approximativement linéaire. Une phase de ralentissement lui succède, puis une phase stationnaire qui correspond au développement maximum du mycélium.

Nous avons constaté que la phase initiale de croissance active correspond bien à une croissance exponentielle, en effectuant le tracé sur papier semi logarithmique (fig. 3). Cette phase exponentielle a une durée de 100 à 120 heures pour les trois types d'ensemencement. Le poids, à l'issue de cette phase, est de 16 à 20 mg. La phase d'allure linéaire dure ensuite 120 à 150 heures. Le poids atteint à la phase stationnaire est de 50 à 55 mg. La pente des courbes, donc la vitesse de croissance, est la même quel que soit le mode d'ensemencement.

Nous n'avons pas de renseignements concernant le "démarrage" de la croissance, la technique de mesure n'étant pas assez précise pour cela.

2.2.2. Analyse et discussion de la cinétique

On sait que les organismes unicellulaires ont une phase active de croissance de type exponentiel tant que leur vitesse de multiplication est constante. Le nombre de cellules, ou le poids, se trouve doublé à chaque génération, c'est-à-dire à intervalles de temps réguliers. Par contre, pour les mycéliums, on admet que la croissance est de type linéaire. L'allongement des hyphes n'aurait lieu que par les extrémités, (conclusion se référant à un travail de SMITH 1923), et la croissance de la masse mycélienne s'effectuerait par la périphérie.

Dans le cas de cultures submergées, où le mycélium peut augmenter librement de volume, cette croissance linéaire s'effectue alors selon une progression cubique. C'est ce que conclut EMERSON (1950) après l'étude de la croissance de Neurospora crassa, les résultats permettant une représentation à peu près linéaire de $\sqrt[3]{P}$ en fonction du temps.

Cependant, EMERSON signale la possibilité d'interpréter également comme une croissance exponentielle le début de la croissance active de Neurospora. Quant à nos résultats, ils ne s'accordent guère avec une variation linéaire de $\sqrt[3]{P}$ en fonction du temps (fig. 4).

On conçoit que dans le cas d'une culture âgée la masse mycélienne centrale ne présente plus de croissance, seule la partie périphérique de la culture se multiplie activement, la croissance se rapproche d'un type linéaire. Mais chez un mycélium jeune, la croissance concerne toute la masse mycélienne, les extrémités des hyphes ne sont pas uniquement périphériques du fait des ramifications.

Il est certain d'autre part, que même dans le cas d'un mycélium jeune, les conditions d'oxygénation s'altèrent plus ou moins rapidement au cours de la croissance et modifient sa cinétique. Si les cultures sont agitées, cette agitation, nous l'avons dit, limite indirectement l'aération du mycélium. Si les cultures ne sont pas agitées, une trop grande épaisseur de la couche liquide freine la diffusion de l'oxygène ; par contre, une faible épaisseur de cette couche permet rapidement à une fraction du mycélium de se développer en surface, ce mycélium aérien place alors le mycélium submergé dans de très mauvaises conditions d'aération. La croissance se trouve donc limitée, à un certain moment, par la faible concentration en oxygène au niveau des hyphes.

Si le vieillissement peut être facilement évité en procédant à des expérimentations de durée convenable, il n'en est pas de même pour le défaut d'oxygénation. C'est lui qui est, à notre avis, responsable de la durée relativement courte de la phase exponentielle chez Neurospora. Seule une réalisation des cultures submergées sous atmosphère d'oxygène, en milieu non ou faiblement agité, permettrait une étude cinétique rationnelle.

2.3. VITESSE ET TAUX DE CROISSANCE

Dans les conditions où nous opérons, la croissance de Phlebia radiata est terminée en 12 à 13 jours. Cette durée ne donne qu'une idée très relative de la vitesse de croissance de cette espèce ; il en est de même pour le poids de substance organique synthétisé pendant ce temps. L'un et l'autre dépendent étroitement des données expérimentales.

La vitesse de croissance, pour être significative, ne doit être limitée par aucun facteur incontrôlable ; seul, le début de la phase active de croissance répond à cette condition.

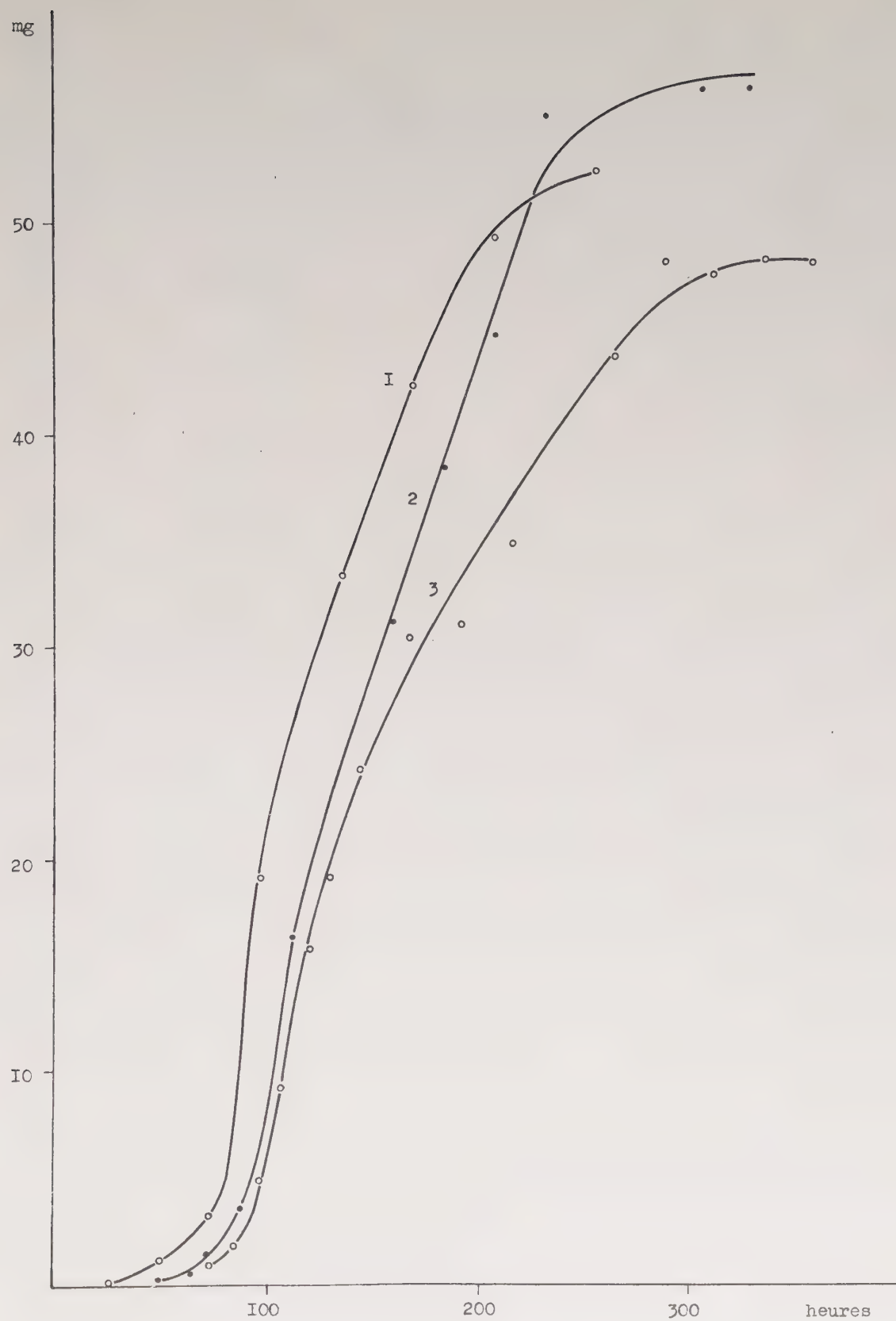


Fig.2 CINETIQUE DE LA CROISSANCE DE PHLEBIA RADIATA

1 ensemencement par boutures
 2 " " mycélium homogénéisé
 3 " " arthrospores

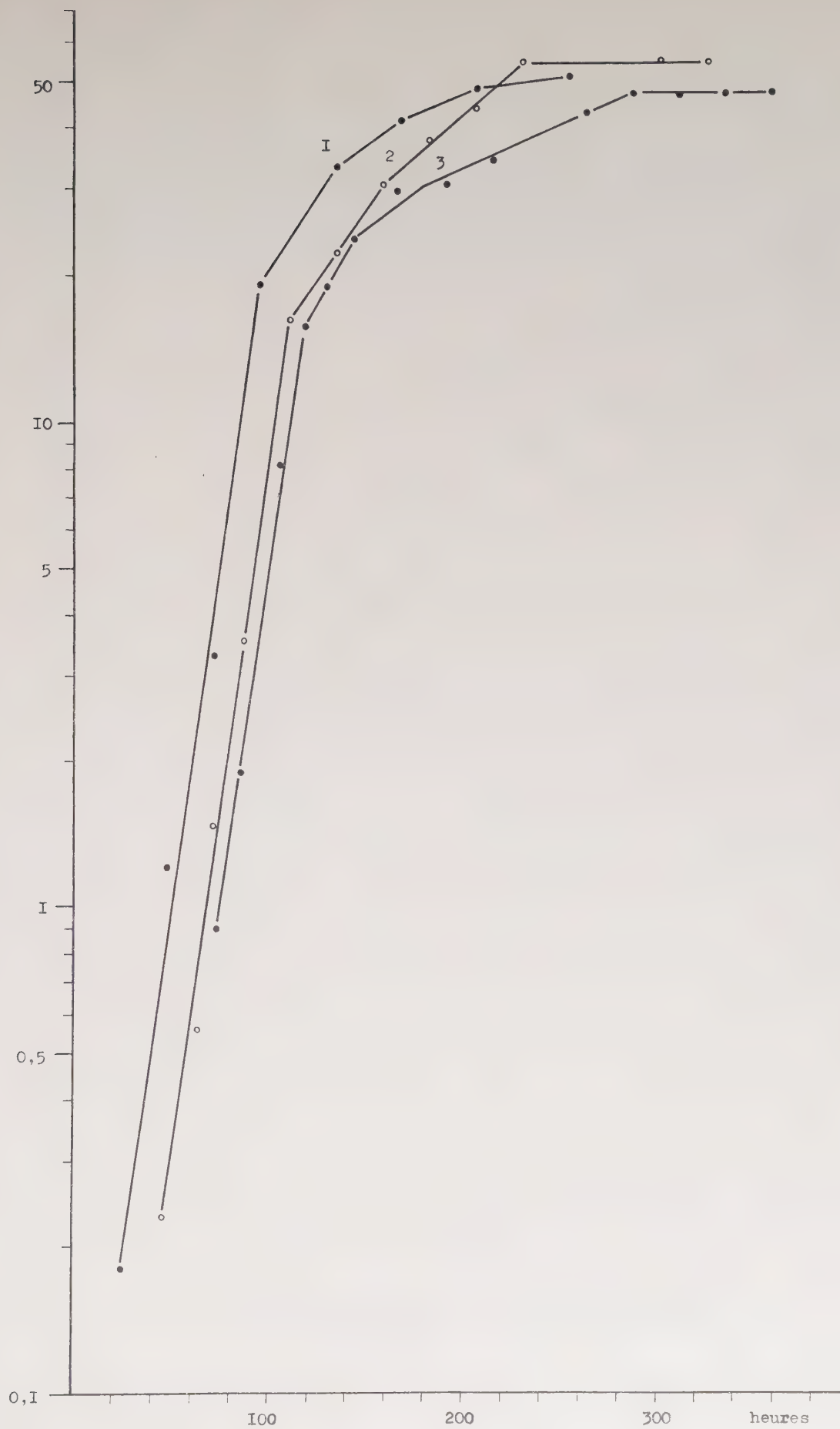


Fig.3 CINETIQUE DE LA CROISSANCE DE PHLEBIA RADIATA
TRACE SEMI-LOGARITHMIQUE

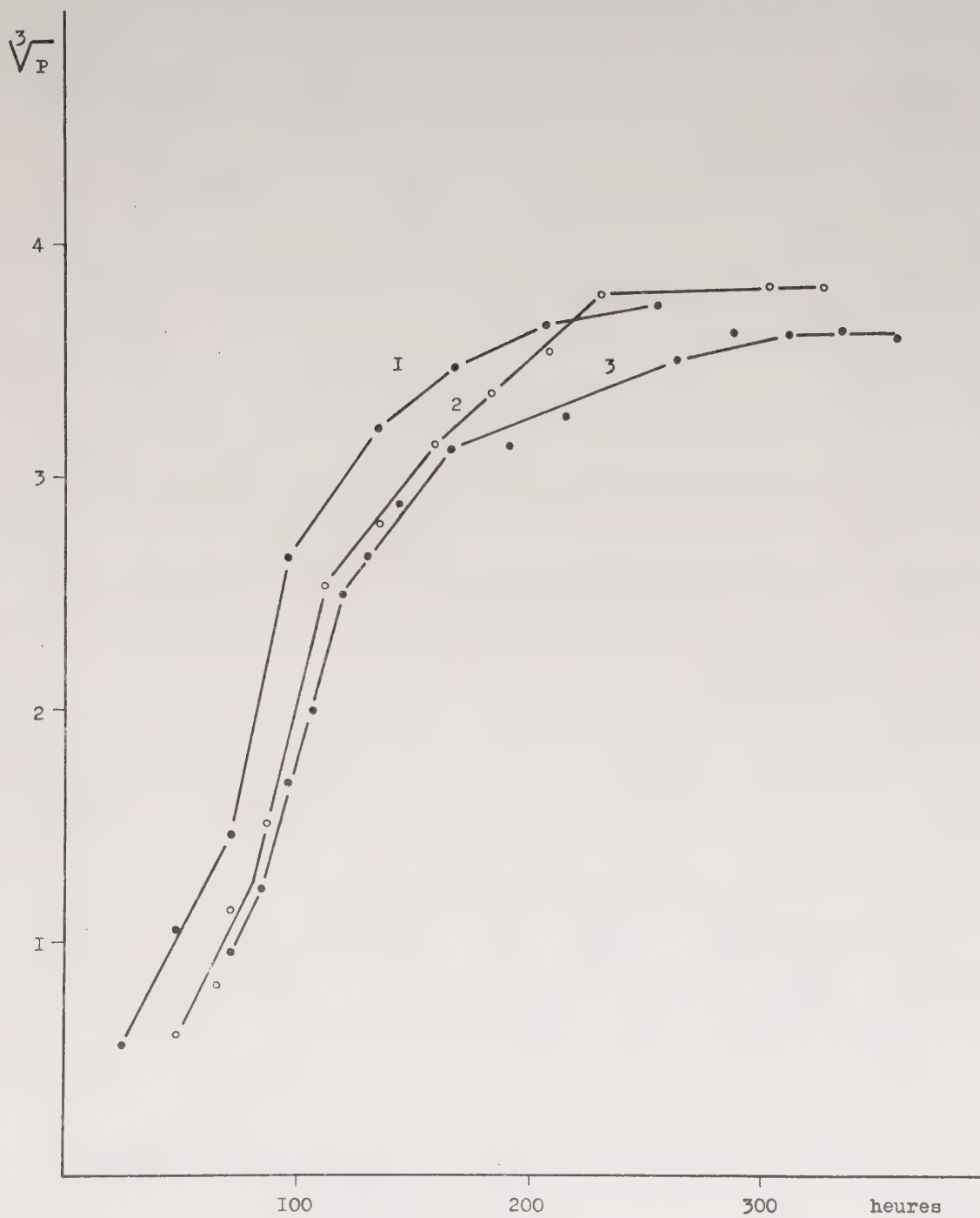


Fig.4

CINETIQUE DE LA CROISSANCE DE PHLEBIA RADIATA
ESSAI D'UN TRACE SELON UNE PROGRESSION CUBIQUE DU POIDS

Pour les organismes unicellulaires, on évalue commodément la rapidité de la croissance, dans la phase exponentielle, par le taux de croissance plutôt que par la vitesse. La croissance étant fonction du nombre de cellules, $\frac{dN}{dt} = f(N)$, on a :

$$\frac{dN}{dt} = k N, \quad \text{d'où } k = \frac{1}{t} \log_e \frac{N}{N_0}$$

Ce taux de croissance, k , exprime en fait l'activité du métabolisme de croissance (MONOD 1958). Comme $\frac{N}{N_0}$ représente le rapport de croissance, il peut être, selon MYERS (1953), aussi bien défini par le rapport des poids $\frac{P}{P_0}$ que par le rapport du nombre de cellules, c'est-à-dire que $k = \frac{1}{t} \log_e \frac{P}{P_0}$.

Pour chacune des trois courbes de croissance de Phlebia radiata, $\frac{P}{P_0}$ est très voisin de 5 pour une durée de 24 H. On calcule ainsi, en prenant 24 H comme unité de temps, que $k = 1,6$. Ce taux de croissance n'est évidemment défini que pour une source donnée d'hydrate de carbone, ici le glucose.

A titre de comparaison, rappelons que la levure de boulangerie, Saccharomyces cerevisiae, présente une génération toutes les 2 heures ; k est voisin de 8 pour une période de 24 heures. Le mycélium de Phlebia radiata ne double son poids qu'en dix heures.

La connaissance du taux de croissance peut présenter un intérêt d'ordre expérimental, par exemple pour calculer exactement l'augmentation de poids d'un mycélium au cours d'une expérimentation manométrique. Ainsi, pour Phlebia radiata, pour des périodes de 4 et 8 heures, t est égal respectivement à $\frac{1}{6}$ et à $\frac{1}{3}$; de $\log_e \frac{P}{P_0} = k t$, avec $k = 1,6$, on tire $\frac{P}{P_0} = 1,3$ et $\frac{P}{P_0} = 1,7$.

2.4. RENDEMENT DE CROISSANCE

Le rendement réel de croissance est la quantité de substance organique synthétisée pendant la croissance pour un poids donné d'hydrate de carbone. Il dépend de la nature des réactions enzymatiques. Ainsi, pour un métabolisme uniquement respiratoire, le rendement théorique est dix fois plus élevé environ que pour un métabolisme purement fermentaire, quand le substrat est le glucose.

Le poids obtenu, à la phase stationnaire de croissance, pour Phlebia radiata, est de 50 à 55 mg, ceci pour 15 cm³ de milieu à 2 % de glucose. Celui-ci étant entièrement consommé, le rendement réel est au plus de 18 %. Il est du même ordre que ceux résultant des expérimentations de JENNISON et al. (1955). Mais nous verrons, dans le chapitre IV, que dans les conditions où nous opérons, le métabolisme devient anaérobie en fin de croissance ; le rendement s'en trouve donc diminué.

3. CROISSANCE A BASSE PRESSION D'OXYGENE ET EN ANAEROBIOSE

3.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Pour les essais de croissance à basse pression d'oxygène, nous avons procédé, pour plus de commodité, à des cultures sur gélose. Les flacons de culture sont des erlens de 100 cm³, fermés par des bouchons en caoutchouc, et munis de deux tubulures opposées, pour l'arrivée et la sortie du courant gazeux. Pour assurer une purge plus efficace des récipients, les tubulures ne sont pas au même niveau : l'une est située à la partie supérieure de l'erlen, l'autre à la partie inférieure, l'écartement est de 4 cm. Un courant d'azote circule en permanence dans les flacons ; pour éviter toute rentrée d'air, la pression à l'intérieur est maintenue à une valeur légèrement supérieure à celle de l'atmosphère extérieure par un dégagement de l'azote sous 3 cm d'eau. Il s'agit d'azote "R" dont la teneur en oxygène est égale ou inférieure à 0,005 %. La pression théorique d'oxygène est donc voisine de 0,04 mm de Hg. Chaque erlen contient 25 cm³ de milieu gélosé. Les essais sont effectués en double. Les erlens sont réunis entre eux par groupe de dix, par des raccords en caoutchouc. Des flacons barboteurs contenant de l'eau stérile servent à humidifier le courant gazeux. Des tampons de coton, peu serrés, sont introduits dans les tubulures de chaque erlen.

Les cultures en anaérobiose sont effectuées en milieu liquide submergé, dans des boîtes de Roux de 1 litre, contenant 500 cm³ de milieu nutritif. Ces flacons sont bouchés hermétiquement et disposés horizontalement. Une circulation d'azote "R" est assurée par deux tubulures disposées sur une même face, et distantes de 12 cm. Les récipients sont purgés pendant 12 heures par un fort courant d'azote. Ils sont agités, ce qui permet l'élimination, en début d'expérimentation, de l'oxygène dissous. Leur atmosphère est maintenue, comme précédemment, en légère surpression par rapport à l'atmosphère externe, pendant toute la durée de l'expérimentation.

Notons que la purge des récipients à culture n'intervient que 12 H après l'ensemencement, mais qu'alors aucune croissance n'est encore appréciable à l'oeil nu. BROCKMAN et STIER (1947) ont montré, pour la

levure de boulangerie, que les conditions antérieures d'aération de l'inoculum semblent avoir une importance déterminante sur les possibilités de croissance en anaérobiose.

3.2. ESPECES CAPABLES DE CROITRE A BASSE PRESSION D'OXYGENE ET ESPECES CAPABLES DE CROITRE EN ANAEROBIOSE

Nous avons fait remarquer qu'un grand nombre de Basidiomycètes poussent fort bien en milieu submergé. Ceci implique déjà, à priori, pour toutes ces espèces, une possibilité de croissance à une concentration en oxygène au plus égale à $2,55 \times 10^{-4}$ M/l. Il est sûr que pour ces espèces, une partie de la croissance s'effectue à des concentrations en oxygène encore plus faibles, quand la masse mycélienne est suffisamment développée, du seul fait de la lenteur de la diffusion de ce gaz dans les milieux non agités, aux températures usitées, (20 - 25°).

Le tableau ci-dessous donne les résultats des essais que nous avons effectués sur milieu gélosé, mais à basse pression d'oxygène ($\leq 0,04$ mm Hg), pour 20 espèces croissant particulièrement bien en milieu submergé. Il s'agit d'espèces lignivores dont 17 Corticiés. La durée des cultures est de 3 semaines. La pousse est appréciée par le diamètre (d) de la surface couverte.

Bonne croissance $d > 2$ cm	Croissance faible $2 \text{ cm} < d < 1 \text{ cm}$	Croissance très faible ou nulle $d < 1$ cm
Merulius rufus Phlebia radiata (souche 221) Corticium ochraceo-fulvum Merulius tremellosus Fistulina hepatica Corticium laeve Phlebia radiata (souche 3062)	Panellus serotinus Odontia hydroides Hymenochete tabacina Peniophora eichleriana Stereum hirsutum Clitocybe olearia Fomes annosus	Corticium caeruleum Stereum purpureum Stereum sericeum Peniophora cinerea Peniophora crenea Daedalea quercina Hymenochete rubiginosa

Il faut remarquer que la gélose n'a pas été dégazéifiée, et que d'autre part, l'appréciation de la croissance sur milieu solide, à la vue de la surface couverte, est très relative.

Pour les essais en anaérobiose, nous avons testé les 13 espèces pour lesquelles nous avons obtenu une croissance, même faible, dans les conditions précédentes. Trois d'entre elles, seulement, donnent des résultats intéressants. Le poids du mycélium, après 20 jours de culture en milieu glucosé à 2 %, est de l'ordre de 400 mg. Il s'agit de Phlebia radiata, Corticium ochraceo-fulvum et Merulius rufus. Les autres espèces ne poussent pas ou ne donnent qu'un mycélium peu abondant, telles Stereum hirsutum, Corticium laeve, Merulius tremellosus et Panellus serotinus.

Ainsi, sur 20 espèces poussant bien en milieu submergé, 3 seulement présentent une aptitude marquée à croître en anaérobiose. Parmi les autres, 10 ont encore une croissance, plus ou moins active, à basse pression d'oxygène. Il est vraisemblable qu'en milieu confiné leur métabolisme est simultanément aérobie et anaérobie, mais leur pouvoir fermentaire doit être faible.

On peut remarquer que les 3 espèces particulièrement aptes à pousser en anaérobiose appartiennent maintenant au genre Phlebia sensu DONK.

3.3. RENDEMENT EN ANAEROBIOSE - ACTION DE LA TENEUR EN HYDRATE DE CARBONE

Le rendement réel de croissance de Phlebia radiata et de Corticium ochraceo-fulvum, dans les conditions d'anaérobiose décrites ci-dessus, et pour des teneurs en glucose de 20 ou 40 g/litre, est voisin de 2 %.

Des mesures pondérales de la croissance de Phlebia radiata à des concentrations en glucose de 1, 2, 4, 8 et 10 % montrent que ce rendement varie avec la teneur en hydrate de carbone. Poids sec du mycélium formé, pourcentage de glucose consommé et rendement réel de croissance sont

reportés dans le tableau IV ; les variations en fonction de la concentration du glucose sont figurés par le graphique de la figure 5.

Il ressort, de ce graphique, qu'au-delà d'une concentration en glucose de 4 % survient une diminution de poids sec formé et que cette diminution est corrélative d'une consommation décroissante du glucose.

Nous constatons, d'autre part, que le rendement réel de croissance n'est pas constant. Il diminue rapidement quand la concentration en glucose passe de 1 à 2 %, la variation est ensuite beaucoup plus faible ou inexistante.

Remarques concernant le rendement :

1°) On peut noter que le rendement est du même ordre que celui de la levure de boulangerie cultivée en anaérobiose.

2°) Il résulte d'une simple coïncidence que le rendement anaérobie soit le 1/10 du rendement aérobie, puisque la valeur de ce dernier est abaissée par des conditions d'aérobiose imparfaites en fin de croissance.

Hypothèses concernant l'action de la teneur en hydrate de carbone sur la croissance.

La diminution de la croissance quand augmente fortement la teneur en glucose peut s'expliquer soit par un déséquilibre du rapport C/N, soit par une action osmotique.

La diminution de rendement réel de croissance peut s'expliquer aussi par un déséquilibre du rapport C/N, la teneur en azote du milieu de Wickerhamm serait déjà insuffisante pour des concentrations en glucose inférieures à 2 %. Mais on peut l'attribuer aussi à une quantité trop faible de facteurs de croissance non synthétisés en anaérobiose et pouvant être apportés par l'implant.

On sait que pour Saccharomyces cerevisiae, la croissance anaérobie n'est jamais proportionnelle à la concentration en glucose, même pour des teneurs inférieures à 1 %, mais qu'elle est augmentée par l'enrichissement du milieu en vitamines et autres facteurs mal déterminés.

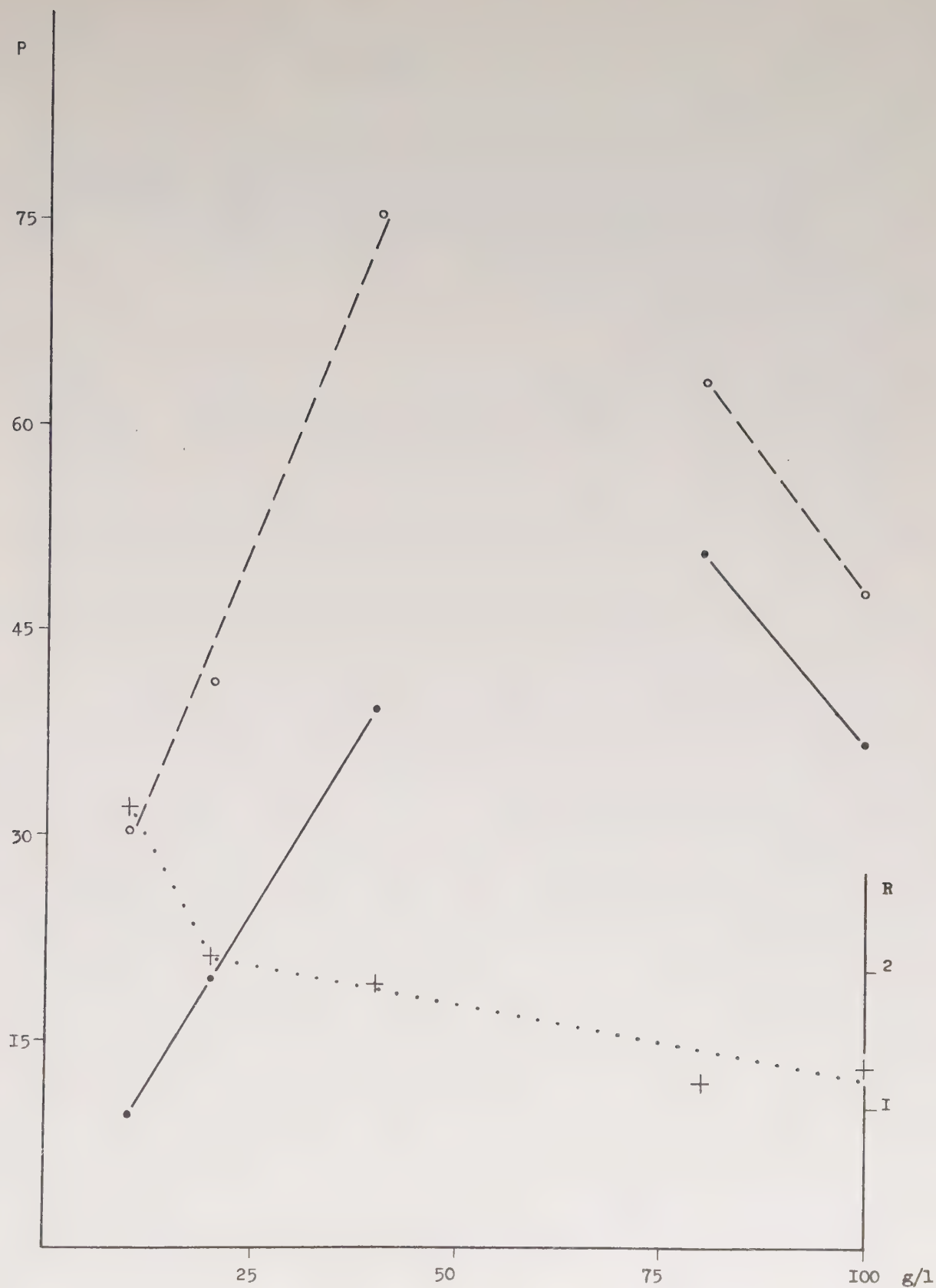


Fig.5 CROISSANCE DE PHLEBIA RADIATA EN ANAEROBIOSE
INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE

tirets: poids de mycélium synthétisé en mg/10
trait continu: poids du glucose consommé en g
pointillés: pourcentage du rendement réel

TABLEAU IV - Rendement de la croissance en anaérobiose
de Phlebia radiata et de Corticium ochraceo-fulvum

	Glucose poids initial g/l	Durée culture en jours	pH final	Poids sec mycélium mg/l	Glucose consom- mé. g/l	Glucose consom- mé. %	Rendement réel %
<u>Ph.</u> <u>rad.</u>	10	20	3,6	305	9,6	96	3,2
	20	22	3,3	412,5	19,5	97	2,1
	40	26	3,1	756	39,5	99	1,9
	30 + 10 maltea	25	3,6	692	34		2
	80	31	2,8	620	51	64	1,2
	100	36	3,1	480	37	37	1,3
<u>C.</u> <u>ochr.</u>	40	17	3,1	697	39,5	99	1,8

4. FACTEUR RESPONSABLE DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES RESULTANT D'UNE CROISSANCE EN MILIEU SUBMERGE

4.1. REMARQUES PRELIMINAIRES

Nous avons rappelé, dans l'introduction de ce chapitre, que le mycélium de certains basidiomycètes présente des modifications quand sa croissance a lieu en milieu submergé. Les boucles, normalement constantes sur les hyphes aériennes, sont rares ou absentes sur les hyphes profondes. Pour diverses Corticiés, cette action du milieu est particulièrement nette et, de plus, non seulement la répartition des boucles, mais aussi le comportement nucléaire du mycélium est affecté ; il s'agit des espèces à "comportement astatocénocytique". BOIDIN (1954) a montré qu'une agitation convenable du milieu liquide où s'effectue la croissance permet l'obtention d'un mycélium normalement bouclé. Quelques remarques d'ordre physiologique nous ont amené à reconsidérer ce problème et à préciser le rôle de l'agitation :

a) Nous avons montré, dans un paragraphe précédent (§ 3.2) que, parmi 20 espèces poussant bien en milieu submergé, trois d'entre elles sont particulièrement aptes à croître en anaérobiose ; il s'agit de Phlebia radiata, Corticium ochraceo-fulvum et Merulius rufus. Or ces 3 espèces ont un comportement nucléaire astatocénocytique (BOIDIN 1964) et sont typiquement dépourvues de boucles en milieu submergé. Nous verrons, dans le chapitre suivant, que leur métabolisme anaérobie est assuré par une fermentation alcoolique. Deux des autres espèces poussant plus ou moins rapidement en atmosphère raréfiée "perdent" également leurs boucles en milieu liquide, ce sont Panellus serotinus (KÜHNER 1950) et Merulius tremellosus (BOIDIN 1954). Nous savons que cette dernière est aussi capable de fermentation alcoolique (NORD et SCIARINI 1946).

b) L'agitation, même très lente, conduit à la formation d'un mycélium en "écheveau" plus ou moins dense. Nous avons pensé que la diffusion de l'oxygène dans la masse mycélienne pouvait être suffisamment ralentie pour que le métabolisme anaérobie remplace, pour une grande part, le métabolisme aérobie ; ceci en particulier pour les

espèces à croissance rapide. Nous avons constaté qu'il en est effectivement ainsi pour Phlebia radiata et Corticium ochraceo-fulvum, (voir chap. IV, § 2.1.2, 2.2.2 et 2.5).

Il résulte de ces remarques : 1°) qu'il existe vraisemblablement un lien entre l'aptitude fermentaire et les modifications morphologiques décrites.

2°) que l'agitation, si elle favorise l'apparition des boucles, ne permet cependant pas, pour ces espèces, une meilleure aération des hyphes, sauf tout au début de la croissance. L'oxygène ne serait donc pas indispensable à la formation des boucles.

Il nous était facile de vérifier ce dernier point par une observation du mycélium obtenu sur milieu gélosé sous atmosphère d'azote.

4.2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL ET ESPECES ETUDIEES

Le dispositif permettant les cultures sous atmosphère contrôlée est le même que celui utilisé pour la recherche des espèces aptes à croître à basse pression d'oxygène (§ 3.1). Les essais sont effectués en double.

Les résultats obtenus nous ont conduit à employer des mélanges gazeux, les détails concernant la réalisation de tels mélanges sont exposés dans le chapitre "Matériel et technique". Le débit des gaz, mesuré à la pression ambiante, est de 900 cm³/heure. La capacité totale des récipients à culture est de 1000 cm³ environ.

Les espèces étudiées sont les espèces déjà citées : Phlebia radiata (souche 3062), Corticium ochraceo-fulvum (souche 1990), Merulius rufus, Merulius tremellosus et Panellus serotinus, bien que cette dernière n'ait qu'une croissance très lente en atmosphère d'azote.

Nous avons toujours vérifié, par des cultures témoins effectuées simultanément, que les boutures utilisées pour ensemercer donnaient bien, en atmosphère normale, un mycélium bouclé.

4.3. OBSERVATION DES CULTURES REALISEES EN ATMOSPHERE D'AZOTE

Ces cultures ont duré 4 semaines pour Phlebia radiata, Merulius tremellosus, Panellus serotinus, et 2 semaines pour Merulius rufus

et Corticium ochraceo-fulvum.

Phlebia radiata : La gélose est entièrement envahie de mycélium ; le centre, sur une surface de 2 cm de diamètre, est légèrement duveteux. A la périphérie, au contact gélose-verre, un fin duvet fournit des hyphes non submergées ayant un diamètre de 2,5 à 3 μ , parfois 2 μ ; leur contenu est très apparent ; les boucles sont nombreuses.

Merulius tremellosus : La culture recouvre toute la surface gélosée qui est parsemée d'un duvet léger, irrégulier. Les hyphes de ce duvet ont de 2 à 3 μ . Leur contenu est beaucoup moins réfringent que chez Phlebia radiata. Ces hyphes sont bouclées. On note quelques chlamydospores de 9,5 x 8 μ environ.

Panellus serotinus : La pousse est faible. L'implant s'est couvert de duvet, il est entouré d'un anneau de duvet très ténu ; le diamètre de la culture n'excède pas 2 cm. Le duvet central est constitué par des hyphes de 3 μ , les chlamydospores sont excessivement nombreuses, elles ont 25 x 17 μ . Les hyphes du duvet marginal ont peu de chlamydospores ; leur diamètre est de 2,5 μ ; elles sont bouclées.

Merulius rufus : Toute la surface gélosée est recouverte ; le duvet est rare. Au centre, l'aspect est crémeux, les hyphes sont peu bouclées. A la périphérie, un léger duvet présente des hyphes ayant le plus souvent de 3 à 6 μ et à boucles peu fréquentes ; certaines hyphes, tortueuses, n'ont que 2,5 μ .

Corticium ochraceo-fulvum : Toute la surface gélosée est envahie par la culture ; fin duvet généralisé ; les hyphes de ce duvet et même les hyphes noyées à la surface de la gélose sont bouclées. Leur diamètre varie de 2 à 4 μ , mais il est le plus souvent de 2,5 μ .

Ainsi, les hyphes du mycélium non submergé sont bouclées, bien que la croissance se soit effectuée en atmosphère dépourvue d'oxygène.

Si l'absence de boucles, observée en milieu submergé, se trouve liée à l'aptitude fermentaire, ce ne peut être qu'indirectement par

l'accumulation, par exemple, d'un produit du métabolisme anaérobie. Ce produit, dans le cas des cultures sur gélose en atmosphère d'azote, serait entraîné par le courant gazeux. Il peut s'agir du gaz carbonique provenant de la fermentation alcoolique. Pour le vérifier, nous avons procédé à des cultures en atmosphère de gaz carbonique pur.

4.4. OBSERVATION DES CULTURES REALISEES EN ATMOSPHERE DE GAZ CARBONIQUE

Ces cultures ont la même durée qu'en atmosphère d'azote ; elles ont d'ailleurs été effectuées simultanément. Comme précédemment, les hyphes observées sont des hyphes non immergées dans la gélose.

Phlebia radiata : La culture présente à peu près le même aspect que dans l'azote, le duvet est encore plus rare. Les hyphes ont de 2,9 à 4 μ , parfois 5 μ ; ces hyphes sont régulières, très peu ramifiées et non bouclées.

Merulius tremellosus : La pousse paraît plus importante que dans l'azote, car le duvet est plus abondant. On note quelques chlamydospores. Les hyphes sont moins ramifiées que dans l'azote ; elles sont plus larges, elles ont fréquemment 3 μ , quelques-unes atteignent 5 μ . Ces hyphes ne sont pas bouclées.

Panellus serotinus : La pousse est la même que dans l'azote. Nous n'avons vu que peu de chlamydospores. Ces hyphes, non bouclées, ont de 2,5 à 3,5 μ .

Merulius rufus : La culture présente, dans la région centrale, plus de duvet que dans l'azote. Ces hyphes sont beaucoup plus régulières, très peu ramifiées et plus larges, puisqu'elles ont souvent de 6 à 9 μ . Elles ne sont pas bouclées.

Corticium ochraceo-fulvum : La pousse est nulle.

4.5. OBSERVATION DES CULTURES REALISEES EN ATMOSPHERE MIXTE, AZOTE - GAZ CARBONIQUE

Nous avons voulu rechercher à partir de quelle teneur le gaz carbonique est susceptible d'agir sur la formation des boucles.

4.5.1. Azote à 5 et 10 % de gaz carbonique

Les boucles paraissent toujours aussi fréquentes. Dans l'azote à 10 % de CO₂, toutes les surfaces gélosées sont entièrement recouvertes après 11 jours de culture ; la croissance de Panellus serotinus semble donc être accélérée par le gaz carbonique.

4.5.2. Azote à 20 % de gaz carbonique

Les observations sont effectuées après 19 jours et parfois comparées à celles faites sur des cultures réalisées simultanément en atmosphère d'azote.

Phlebia radiata : le duvet paraît plus long que sous atmosphère d'azote ; les hyphes sont plus larges ; les boucles semblent moins nombreuses.

Merulius tremellosus : la pousse est beaucoup plus importante que dans l'azote. Les hyphes sont bouclées.

Panellus serotinus : la surface gélosée est presque entièrement recouverte, la pousse est, là aussi, beaucoup plus importante que dans l'azote. Le duvet est assez abondant au centre, les hyphes sont bouclées. Les hyphes du duvet prélevé à la périphérie nous ont paru non bouclées.

Merulius rufus : la gélose est entièrement recouverte par un duvet fin très appliqué. Les hyphes sont plus larges que dans l'azote, et les boucles plus rares.

Corticium ochraceo-fulvum : L'aspect et les observations effectuées sont les mêmes que pour la culture dans l'azote.

4.5.3. Azote à 30 et 50 % de gaz carbonique

Après 10 jours de culture, le mycélium non submergé de Merulius rufus est dépourvu de boucles, son aspect est le même qu'en atmosphère de gaz carbonique pur. Par contre, nous avons noté la présence de boucles dans toutes les autres cultures.

Pour Phlebia radiata, les boucles trouvées sur une même hyphe sont plus distantes les unes des autres qu'en atmosphère normale, et le diamètre des hyphes est plus large, fréquemment 4 μ au lieu de 2,5 à 3 μ . Quant à Panellus serotinus, son mycélium paraît ne pas être bouclé dans certains secteurs et les hyphes sont plus larges qu'en atmosphère ordinaire ou qu'en atmosphère d'azote.

4.6. CONCLUSION - DISCUSSION SUR L'ACTION DU GAZ CARBONIQUE

Chez les 5 espèces étudiées, la croissance en atmosphère d'azote, donc en absence d'oxygène, n'affecte pas par elle-même la répartition des boucles et ne modifie ni la largeur, ni la ramification des hyphes. Par contre, les hyphes non submergées ayant poussé en atmosphère de gaz carbonique pur sont, d'une façon générale, plus larges, plus régulières, peu ramifiées et dépourvues de boucles.

Le gaz carbonique agit donc à la fois sur la répartition des boucles et sur la taille des hyphes. Nous rapprochons de cette constatation l'observation faite par BOIDIN (1954) sur diverses espèces à boucles inconstantes : dans des conditions de moyenne aération, les boucles, devenues variables, ornent de préférence les hyphes étroites.

On peut attribuer les modifications observées en milieu submergé à l'accumulation, dans ce milieu, du gaz carbonique.

Il est difficile de préciser à partir de quelle teneur le gaz carbonique agit ; son action est progressive ; ainsi, les boucles sont d'abord rares, puis absentes. Il faudrait, sur une même culture, multiplier les observations. Mais il est sûr que la formation des boucles n'est définitivement annihilée qu'à de fortes concentrations. Dans ces conditions, est-il toujours possible de rendre le gaz carbonique

responsable de leur disparition en milieu profond ?

Parmi les espèces testées, celles qui présentent le "comportement astatocénocytique" le plus typique sont justement les espèces capables de croître le mieux en anaérobiose, c'est-à-dire capables du métabolisme fermentaire le plus actif. Nous avons dit qu'il s'agissait d'une fermentation alcoolique. Leur dégagement de gaz carbonique est donc abondant. Le volume rejeté, en milieu profond, par fermentation, est 5 à 10 fois plus important que celui fourni, dans les mêmes conditions, par la respiration de toute autre espèce. Que ce soit en milieu gélifié, ou en milieu submergé non agité, le gaz carbonique ainsi rejeté par le mycélium ne peut être éliminé par diffusion aussi vite qu'il est produit. Il s'établit dans le milieu, de la surface vers la profondeur, un gradient croissant de concentration. Au niveau des hyphes quelque peu profondes, on peut considérer que le milieu est saturé en gaz carbonique. Il est d'ailleurs fréquent de voir apparaître de grosses bulles au sein de la masse mycélienne des Phlebia cultivés dans ces conditions. Or, à 25°, le coefficient de solubilité du CO_2 est 0,76 ; (il est pratiquement 0,90 à 20°). C'est-à-dire que la concentration en CO_2 au voisinage des hyphes ainsi submergées n'est pas tellement inférieure à celle d'une atmosphère de gaz carbonique pur ; on conçoit que les boucles ne se forment plus. A un niveau intermédiaire, la concentration en gaz carbonique étant moindre, les modifications morphologiques sont moins accentuées.

BOIDIN a montré que si la croissance s'effectue en milieu liquide agité, le mycélium secondaire est bouclé. L'agitation, à notre avis, ne supprime pas le métabolisme anaérobie mais permet cependant l'élimination du gaz carbonique si le mycélium n'est pas trop compact.

Nous rendons donc l'accumulation du gaz carbonique responsable de la perte des boucles et de l'installation de la cénocytie.

Sans préjuger du mode d'action du gaz carbonique, on peut cependant rapprocher de l'augmentation de la taille des hyphes, l'effet stimulant qu'a montré ce gaz sur la croissance de Merulius tremellosus et de Panellus serotinus. Il est connu que le CO_2 peut stimuler la croissance (COCHRANE 1958), mais en général à plus faible concentration.

On peut aussi considérer que la moindre ramification des hyphes, comme la disparition des boucles, lesquelles sont en fait des ramifications d'un type spécial, relève d'une même inhibition.

Cette action d'un facteur environnant, le CO_2 , sur la morphogénèse des hyphes, n'est pas sans rappeler celle des bicarbonates sur la formation des "spores résistantes" des Blastocladiella, (CANTINO 1956), ou mieux, celle du gaz carbonique lui-même sur la formation de ces "spores résistantes" chez Blastocladia pringsheimii, (CANTINO 1949).

5. RESUME DU CHAPITRE II

La cinétique de la croissance de Phlebia radiata en milieu liquide glucosé est étudiée pour 3 modes différents d'ensemencement : par boutures, par mycélium homogénéisé et par arthrospores. Dans les 3 cas la croissance s'effectue d'abord selon une cinétique d'allure exponentielle ; cette première phase dure 100 à 120 heures. La croissance est ensuite linéaire pendant 100 à 150 heures. Une brève phase de ralentissement précède l'arrêt de la croissance.

Pendant la phase exponentielle, le taux de la croissance pour une période de 24 heures est de 1,6. Le rendement global est de 18 %.

Beaucoup de Basidiomycètes sont capables de pousser au sein d'un milieu liquide, donc à une concentration en oxygène relativement faible. A très basse pression d'oxygène, 6 espèces sur 20 ont encore une bonne croissance. En anaérobiose, 3 seulement ont une croissance nette.

Le rendement réel de la croissance en anaérobiose est de 2 % pour un milieu contenant 20 g de glucose par litre. Ce rendement varie avec la concentration en glucose.

On sait que la culture en milieu liquide entraîne des modifications du mycélium secondaire de certains Basidiomycètes. Ce mycélium normalement bouclé à l'air, est, en milieu profond, dépourvu de boucles ; de plus, son comportement nucléaire devient anarchique. Nous montrons que l'absence d'oxygène n'est pas responsable. En atmosphère d'azote, sur milieu gélosé, le mycélium reste bouclé. Par contre, en atmosphère de gaz carbonique, les boucles ne se forment pas ; de plus, les hyphes ont un diamètre plus élevé et sont moins ramifiées.

Ainsi le facteur environnant intervenant sur la morphogénèse du mycélium des espèces astatocénocytiques est la forte teneur de gaz carbonique accumulé dans le milieu de culture, et provenant du métabolisme fermentaire.

CHAPITRE III

METABOLISME ANAEROBIE

DU GLUCOSE

1. INTRODUCTION

Si le métabolisme anaérobie des levures, en particulier celui de Saccharomyces cerevisiae, a été étudié de façon détaillée et a fait l'objet de très nombreuses mises au point, celui des champignons filamenteux est par contre bien moins connu.

Des travaux consacrés aux moisissures, notamment aux Mucor, montrent que ces derniers sont les agents d'une fermentation alcoolique comparable à celle des levures. Les Rhizopus, par contre, sont à l'origine d'une fermentation hétérolactique. On sait aussi que quelques Aspergillus, et surtout les Fusarium produisent une fermentation alcoolique.

En ce qui concerne les Basidiomycètes, nos connaissances sont beaucoup plus sommaires. La production d'éthanol dans les milieux de culture de diverses espèces, en particulier de destructeurs de bois, a été plusieurs fois signalée. Mais les études quelque peu précises, tant qualitatives que quantitatives, des produits résultant d'un métabolisme fermentaire, sont rares, et aucune intensité fermentaire ne paraît avoir été mesurée.

NORD et SCIARINI (1946) ont montré que Fomes annosus, Merulius niveus, tremellosus et confluens, produisent des quantités stoechiométriques d'éthanol, mais l'alcool est en partie déshydrogéné ultérieurement pour donner de l'acétaldéhyde et de l'acide acétique. En

absence d'air (fermentation en atmosphère d'azote), la quantité d'alcool accumulée est plus grande, en particulier dans le cas de Fomes annosus ; le processus de déshydrogénation est notablement diminué. La présence de l'acide succinique, qui est un produit secondaire typique de la fermentation alcoolique par la levure a toujours été notée, mais par contre, les auteurs ne font aucune remarque sur la présence ou l'absence du glycérol.

PERLMAN (1949 et 1950) a dressé un bilan de la dégradation du glucose par Polyporus anceps en culture plus ou moins aérée. De l'éthanol s'accumule dans le milieu, mais seulement à raison de 1 mole par mole de glucose consommé, ainsi que de l'acide acétique. Ce dernier résulterait là aussi de la déshydrogénation de l'alcool. Il apparaît également de l'acide oxalique, provenant de l'oxydation de l'acide acétique. L'auteur ne recherche ni l'acide succinique ni le glycérol, et ne procède à aucune analyse des produits accumulés en milieu strictement anaérobie.

2. OBSERVATION ET MESURE D'UN DEGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE D'ORIGINE FERMENTAIRE CHEZ QUELQUES ESPECES

2.1. OBSERVATION D'UN DEGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE D'ORIGINE FERMENTAIRE EN MILIEU CONFINÉ

Nous avons recherché, parmi plus de 50 espèces diverses, celles qui sont susceptibles de donner lieu, en milieu confiné, à un dégagement de gaz carbonique d'origine fermentaire. Nous avons eu recours, pour cela, au test des "tubes paraffinés". L'oxygène utilisé par le mycélium est uniquement l'oxygène dissous au préalable dans le milieu liquide. Si la quantité de gaz carbonique produit pendant la croissance est suffisante, le bouchon de paraffine est repoussé par le gaz qui s'accumule entre le liquide et ce bouchon. Le coefficient de solubilité de CO_2 étant bien supérieur à celui de l'oxygène, (dans l'eau, à 25° , $\alpha \text{O}_2 = 0,028$ et $\alpha \text{CO}_2 = 0,76$), cette accumulation prouve que le volume de gaz carbonique rejeté est nettement plus important que le volume d'oxygène consommé. On peut ainsi attribuer une origine fermentaire à ce gaz carbonique.

Nous n'avons considéré comme significatif que les déplacements de bouchon de paraffine supérieurs à 4 mm et nous ne les avons pas chiffrés. Cela aurait été illusoire, l'adhérence du bouchon aux parois du tube n'étant certainement pas la même pour tous les essais. Le résultat de ces observations est donné par le tableau ci-après (tableau V).

Bien que ces tests n'aient qu'une valeur comparative, ils montrent clairement que Phlebia radiata, Merulius rufus et Corticium ochraceo-fulvum produisent un dégagement intense de gaz carbonique, preuve d'un métabolisme anaérobie actif.

2.2. MESURE DE L'INTENSITE FERMENTAIRE POUR QUELQUES ESPECES

La mesure manométrique du gaz carbonique rejeté en atmosphère d'azote par Phlebia radiata, Merulius rufus et Corticium ochraceo-

TABLEAU V - Tests des tubes paraffinés

+ tests positifs
 +++ " " pour lesquels le rejet gazeux est très abondant.
 (Les Aphyllophorales sont classées selon BOURDOT 1928)

Armillaria mellea	+ Odontia hydroides
Clitocybe olearia	Polyporus sulfureus
+ Panellus serotinus	Leptoporus caesius
	+ " amorphus
Porothelium fimbriatum	Coriolus versicolor
Corticium caeruleum	" connatus
+ " laeve	Daedalea biennis
+++ " ochraceo-fulvum	+ Lenzites quercina
" flavescens	" tricolor var confragosa
+ Peniophora crenea	" sepiaria
" eichleriana	Trametes hispida
" incarnata	+ " gibbosa
" cinerea	+ Ungulina annosa
" cinerea var piceae	" betulina
" pilatiana ⁽¹⁾	Ganoderma lucidum
Aleurodiscus polygonioides	Phellinus robustus
+++ Phlebia aurantiaca (= radiata)	" ignarius var fulvus
+ Merulius tremellosus	" laevigatus
+++ " rufus	+ " ferreus
" phlebioides	+ Xanthochrous pini var abietis
+ Stereum hirsutum	" vulpinus
" striatum (2)	" obliquus
" spadiceum	Poria vulgaris
" chailletii	Fistulina hepatica
" purpureum	
Hymenochete tabacina	
" rubiginosa	

(1) P. pilatiana Pouz. et Svre. : espèce décrite ultérieurement.

(2) S. striatum Fr. : espèce américaine.

fulvum montre que le dégagement est relativement important. Pour ces trois espèces, $Q_{CO_2}^N$ est de l'ordre de 90 - 100, (tableau VI). Ce dégagement est constant ; nous donnons, fig. 6, le graphique des relevés manométriques effectués pendant 8 heures pour des mycéliums de Phlebia radiata. S'il apparaît une légère augmentation du volume rejeté par unité de temps, cela tient à la croissance qui se poursuit dans les fioles pendant l'expérimentation.

On peut remarquer, dans les résultats notés dans le tableau VI, une certaine variabilité. Nous avons constaté, au cours des différentes mesures d'intensité fermentaire que nous avons eu l'occasion d'effectuer pour ces espèces, qu'elle pouvait atteindre $\pm 15 \%$. Ceci n'est pas exceptionnel. SLONIMSKI (1952) a observé, pour la levure, des variations de l'intensité fermentaire de l'ordre de $\pm 18 \%$.

Pour les espèces comme Merulius tremellosus, Phlebia radiata (3062), Corticium laeve dont la croissance en anaérobiose est d'ailleurs bien moindre, l'intensité fermentaire est aussi bien plus faible, (tableau VI). Elle n'atteint pas 8 pour Panellus serotinus. De plus, le dégagement du gaz carbonique paraît diminuer en cours d'expérimentation. Il est possible qu'une fraction du CO_2 rejeté au début des mesures provienne encore du métabolisme aérobie antérieur à l'expérimentation.

TABLEAU VI - Mesure de l'intensité fermentaire de quelques Basidiomycètes.

	P. s. par fiole Δ h par 1/2 H en mm en mg				μ l CO ₂ en 1 H 1/2	$\frac{N_2}{Q_{CO_2}}$	$\frac{N_2}{Q_{CO_2}}$ moyen
<u>Phlebia</u> <u>radiata</u>	2,5 2 2,1 2,8	80,5 60,5 71 108,5	82,5 61 69,5 108	83,5 62 72 110,5	345,5 256,9 297,7 457,8	92,1 85,6 94,5 107,7	95
<u>Corticium</u> <u>ochraceo-</u> <u>fulvum</u>	0,27 0,28 0,21 0,39	9 11,5 9 14,5	8,5 12 8,5 13,5	9,5 12,5 9 14,5	38,3 50,2 37,1 60	94,4 119,2 117,6 102,5	108
<u>Merulius</u> <u>rufus</u>	1,55 1,80 2,40 2,20	51 55 69 64,5	49,5 59,5 70 76,5	48 56,5 71,5 70	207,9 239,4 297,7 295,4	89,4 88,6 81,8 89,5	87
<u>Merulius</u> <u>tremellosus</u>	0,47 0,36 0,40 0,47	4,5 5,5 6 5	5,5 4,5 4 3,5	4 3,5 3 2	19,6 18,6 18,3 14,5	27,6 34,4 30,5 20,4	28
<u>Phlebia</u> <u>radiata</u> (3062)	2,85 2,40 1,50 1,45	19 17,5 12 10	20 20 14 12	18 15 8 11	79,8 73,5 49,5 44,5	18,6 20,4 21,8 20,4	23
<u>Corticium</u> <u>laeve</u>	9,65 6,80 5,75 7,75	49 44 19 38	47 37 18 37,5	45 37,5 16,5 33,5	197,4 165,9 77,6 147,1	13,5 16,2 8,9 12,6	13
<u>Panellus</u> <u>serotinus</u>	8,70 6,85 2 7,95	29,5 19 9,5 20,5	22,5 13,5 8,5 17	19 11 5,5 14	99,4 60,9 32,9 72,1	7,6 5,9 10,9 7	8

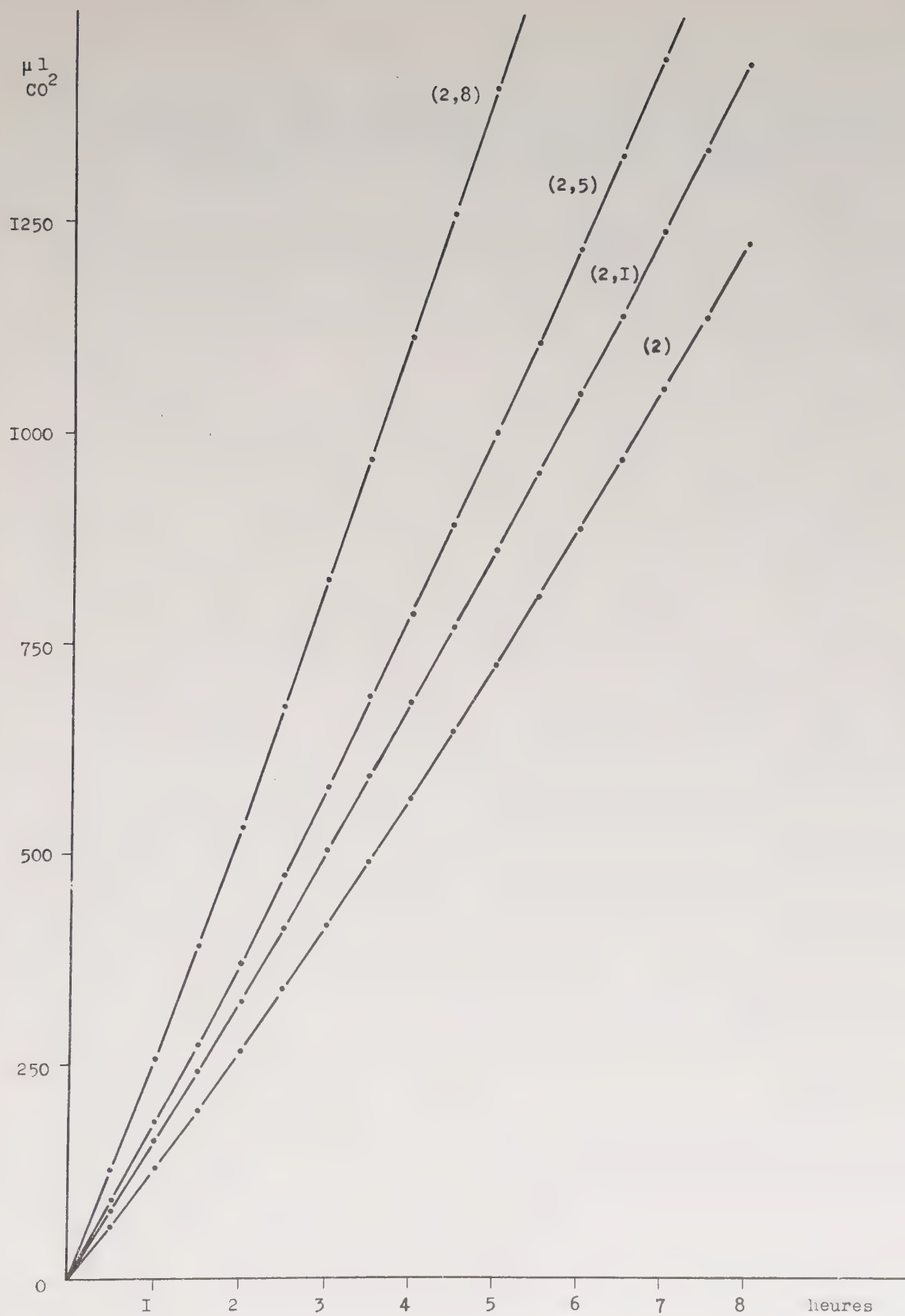


Fig.6 REJET DE GAZ CARBONIQUE EN ANAEROBIOSE
PAR PHLEBIA RADIATA

entre parenthèses: poids sec de mycélium par fiole en mg

3. MISE EN EVIDENCE ET ETUDE DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DE PHLEBIA RADIATA ET CORTICIUM OCHRACEO-FULVUM

3.1. CONDITIONS ET METHODE D'EXPERIMENTATION

Nous avons procédé à des cultures en anaérobiose stricte afin d'éviter une dégradation éventuelle des produits fermentaires par la respiration.

Le dispositif expérimental est le même que celui décrit dans le paragraphe relatif à la croissance en anaérobiose, c'est-à-dire : flacons de 1 litre contenant 0,5 l de milieu nutritif, disposés horizontalement et agités ; atmosphère d'azote "R" maintenue par circulation ininterrompue. Un flacon piège, destiné à recueillir les produits volatils entraînés, est disposé à la sortie du courant gazeux.

Après une croissance suffisante du mycélium, le milieu de culture est analysé. Les alcools sont décelés par chromatographie sur papier. Ils sont au préalable transformés en xanthogénates ; seul le glycérol est recherché directement, sous forme libre ou sous forme d'ester phosphorique, après concentration du milieu. L'éthanol est dosé par la méthode de NICLOUX. Les acides volatils sont extraits par entraînement à la vapeur, analysés qualitativement par chromatographie sur papier et dosés globalement par acidimétrie. Les acides fixes sont extraits au perforateur, par l'éther, après acidification du milieu, puis analysés et dosés comme les acides volatils. Le glucose non utilisé est évalué par la méthode de l'anthrone. Quelques précisions sur ces techniques sont données dans le chapitre I.

Le gaz carbonique, résultant de la dégradation anaérobie d'une quantité donnée de glucose, est mesuré indépendamment, par la méthode manométrique de WARBURG. Le liquide de suspension des mycéliums dans les fioles est initialement exempt de glucose ; c'est un milieu salin équilibré dont la composition par litre est la suivante : PO_4KH_2 , 6 g ; ClNa , 3 g ; Cl_2Ca , 1,5 g ; SO_4Mg , 0,5 g. Chaque fiole reçoit 1,6 cm³ de ce milieu. Puis, grâce au diverticule latéral, 0,4 cm³ de solution glucosée à 900 mg/l, soit 2 μ M de glucose, sont ajoutés. L'anaérobiose

étant établie, les mesures manométriques sont effectuées à intervalles de temps réguliers, jusqu'à la fin du dégagement gazeux consécutif à l'apport du glucose.

Pour limiter l'interférence d'un métabolisme endogène fermentaire (que nous étudions dans le chapitre V), les mycéliums sont au préalable "inanitiés" par un séjour de 5 heures dans le milieu salin équilibré. Après ce temps, leur $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ en l'absence de substrat est de 3 environ.

3.2. VOLUME DE GAZ CARBONIQUE REJETÉ PAR MOLE DE GLUCOSE FERMENTE

Les résultats d'une double mesure (essai I et essai II) effectuée sur Phlebia radiata sont illustrés par le graphique de la figure 7. Le volume de gaz carbonique dégagé, depuis l'addition des 2 μ M de glucose jusqu'au moment où la fermentation reprend la faible valeur qu'elle avait initialement, est respectivement, pour chacun des essais, de 88 et 96 μ l. Il correspond à la dégradation du glucose fourni si le métabolisme endogène est nul. Si ce métabolisme persiste avec la même intensité pendant toute l'expérimentation, ce volume n'est que de 68 μ l pour l'essai I et 74 μ l pour l'essai II. Le volume moyen de gaz carbonique dégagé par la fermentation d'une molécule-gramme de glucose est donc compris entre 34 et 48 litres.

3.3. ANALYSE ET DOSAGE DES PRODUITS DE FERMENTATION ACCUMULES DANS LE MILIEU

Dans le cas de Phlebia radiata, des milieux de WICKERHAM contenant 1, 2, 4, 8 et 10 % de glucose sont soumis aux essais. Pour Corticium ochraceo-fulvum, la concentration en glucose est de 4 %. De plus, les produits accumulés par Phlebia radiata après culture sous atmosphère ordinaire, sont également analysés. Les résultats pondéraux sont récapitulés dans le tableau VII.

Le principal produit fermentaire autre que le gaz carbonique, est l'éthanol. Il s'agit donc d'une fermentation alcoolique. La quantité d'éthanol formée est de 2 moles par mole de glucose dégradée, et cela, jusqu'à une teneur en glucose de 8 %.

Nous trouvons de plus, dans tous les milieux, l'acide acétique,

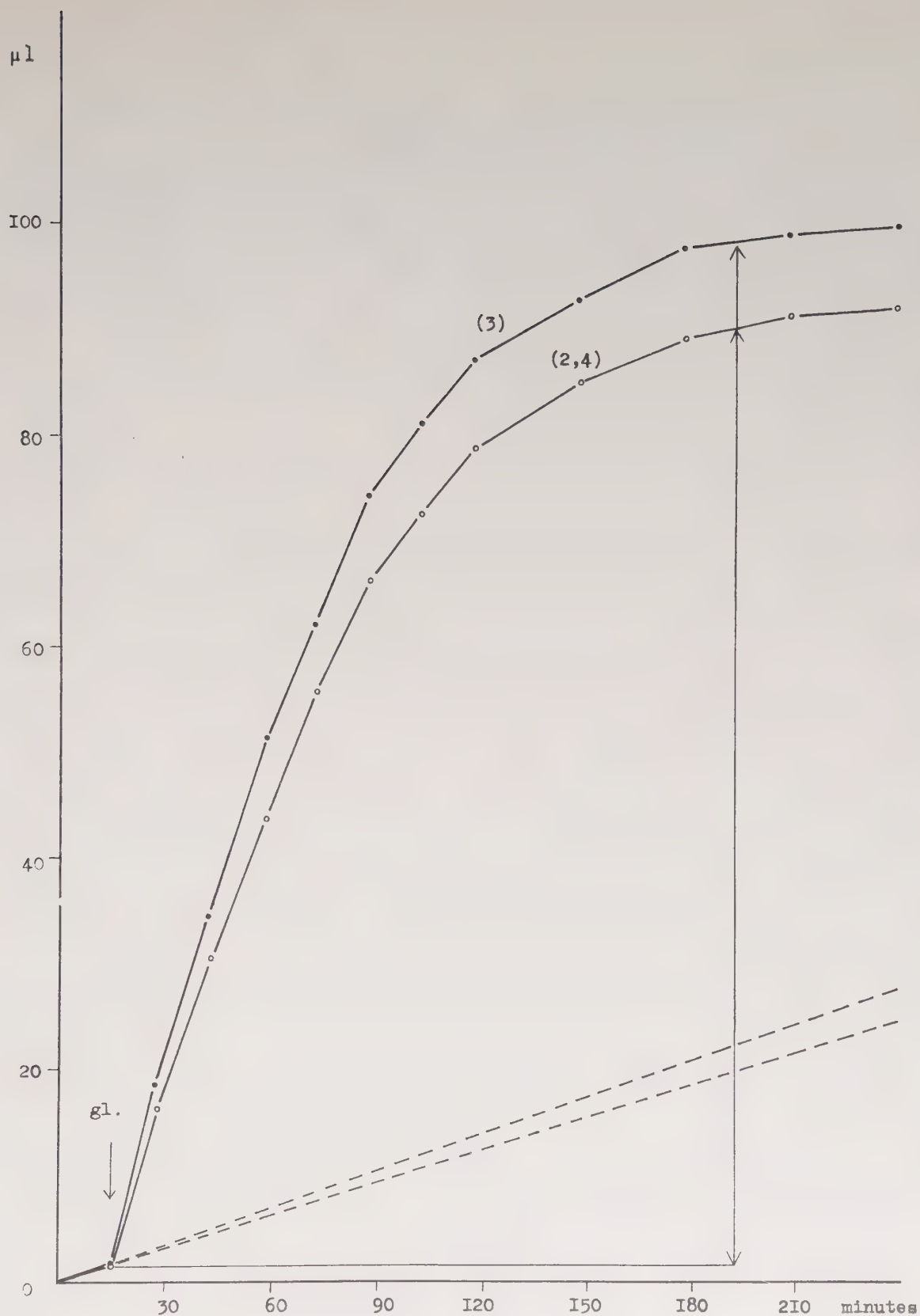


Fig.7 DEGAGEMENT DU CO₂ RESULTANT DE LA FERMENTATION DE 2 μM DE GLUCOSE
PAR PHLEBIA RADIATA

entre parenthèses: poids sec par fiole en mg

TABLEAU VII - Fermentation du glucose par Phlebia radiata
et Corticium ochraceo-fulvum.

	sous atmosphère d'azote							sous atmos. ordin.
	<u>Ph. radiata</u>						<u>C.</u> <u>ochr.</u>	<u>Ph.</u> <u>rad.</u>
c. initiale glucose g/l	10	20	40	30 + 10 maltea	80	100	40	40
durée culture en jours	20	22	26	25	31	36	17	25
glucose consommé g/l	9,6	19,5	39,5	34	51	37	39,5	31
éthanol g/l	5	10,1	20,8	17	25	12,3	19,5	15,6
acides fixes méq./l	1,34	2,95	7,90	4,61	6,60		8,6	4,2
acides volatils méq./l	0,5	0,6	0,5	0,8	0,8		0,85	0,3
<u>mol.éth.</u> <u>mol. gluc.</u>	2	2	2	2	2	1,2	2	2

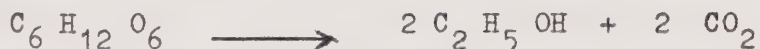
les diacides succinique et malique, et, en quantité très minime, les acides lactique et citrique. A part l'acide malique, tous ces acides apparaissent normalement au cours de la fermentation alcoolique par la levure et sont qualifiés de produits "secondaires". Par contre, nous constatons l'absence du glycérol.

Remarquons enfin qu'il n'apparaît pas de différence, dans ces conditions d'expérimentation, entre les produits accumulés sous atmosphère normale et sous atmosphère d'azote.

3.4. DISCUSSION DES RESULTATS

3.4.1. Equation globale de la fermentation

Il s'agit d'une fermentation alcoolique dont le bilan global peut être schématisé, comme pour la levure, par l'équation classique de GAY-LUSSAC :



Pour une mole de glucose fermenté apparaissent en effet 2 molécules-gramme d'éthanol et un volume de gaz carbonique compris entre 34 et 48 litres, ce qui est proche des 44,8 litres prévus. Les autres produits formés sont en quantité très faible par rapport à l'alcool.

Il ne se produit pas, contrairement à ce qui a été remarqué par NORD et SCIARINI (1946) pour Fomes annosus notamment, et par PERLMAN (1949, 1950) pour Polyporus anceps, de déshydrogénation partielle de l'éthanol.

3.4.2. Signification des produits secondaires

On sait depuis les travaux de MEYERHOF, KIESSLING et SCHULZ (1937) que les produits apparus au cours de la dégradation anaérobie du glucose par les levures, résultent, en fait, de deux fermentations :

1°) la fermentation alcoolique proprement dite, qui par les intermédiaires esters-phosphoriques, aldéhyde phosphoglycérique, acide phosphoglycérique, acide pyruvique, aldéhyde acétique, aboutit à la formation d'éthanol. Cette fermentation est schématisée par l'équation globale de GAY-LUSSAC.

2°) la fermentation glycéropyruvique de NEUBERG, dite fermentation

secondaire, qui est à l'origine des divers "produits secondaires", notamment de l'acide succinique, de l'acide acétique et du glycérol. Cette fermentation commence pendant la phase d'induction, c'est-à-dire avant l'apparition d'acide pyruvique, donc d'acétaldéhyde, quand l'oxydo-réduction normale ne peut se faire ; l'oxydation aldéhyde - acide phosphoglycérique est alors couplée avec la réduction aldéhyde phosphoglycérique-phosphoglycérol. Elle se poursuit pendant toute la fermentation, dans la très faible mesure où l'oxydoréduction normale n'est plus assurée, par suite de la transformation d'une fraction minime de l'acide pyruvique en "produits secondaires" divers et non en acétaldéhyde.

RIBEREAU-GAYON et al. (1955) et LAFON (1955) ont montré, par de nombreux bilans, qu'il existait une corrélation entre la quantité de glycérol formé et la somme des autres produits secondaires.

Nous avons trouvé, après fermentation de 10 g de glucose, une quantité d'acides fixes égale à 1,34 méq. Si l'on néglige les acides lactique et citrique, qui ne sont présents qu'à l'état de traces, cela représente au plus 0,67 mM d'acides succinique et malique. Cette teneur est du même ordre que celle trouvée pour l'acide succinique seul dans le cas de la fermentation par les levures, et ces deux acides, malique et succinique, sont très proches l'un de l'autre. Par contre, la proportion d'acide acétique est plus faible. Mais c'est surtout l'absence du glycérol qui constitue une différence notable.

Le glycérol, accumulé dans le milieu, représente normalement 3 à 4 % du poids du sucre fermenté. Quel que soit le type de levure, levure à haut pouvoir fermentaire comme les Saccharomycodes, ou à capacité fermentaire moindre, comme les Torulopsis, Hansenula par exemple, le rapport glycérol alcool, en fin de fermentation, est toujours le même (RIBEREAU-GAYON et al. 1955). De même sa présence paraît constante dans les produits de la fermentation alcoolique par les champignons autres que les levures. Remarquons cependant que NORD et SCIARINI (1946), à propos des produits de la fermentation alcoolique par divers Merulius, notent l'acide succinique mais ne disent rien de la présence ou de l'absence du glycérol.

L'absence du glycérol implique évidemment l'absence d'une fermentation secondaire glycéropyruvique. L'origine des produits mineurs reste à préciser.

4. RESUME DU CHAPITRE III

Sur 50 Basidiomycètes testés, 3 seulement ont un métabolisme fermentaire actif. Il s'agit de Phlebia radiata, Corticium ochraceo-fulvum et Merulius rufus. Leur $Q_{CO_2}^{N_2}$ est de l'ordre de 100.

Les produits fermentaires dégagés ou accumulés dans le milieu de culture, sous atmosphère d'azote, sont recherchés et dosés dans le cas de Phlebia radiata et de Corticium ochraceo-fulvum. Il s'agit principalement d'éthanol et de gaz carbonique, dont les quantités formées, par mole de glucose fermenté, correspondent à l'équation globale de la fermentation alcoolique par la levure. Des produits mineurs apparaissent également ; ce sont, en faible quantité, les acides succinique et malique et, à l'état de traces, les acides lactique et citrique. Le glycérol n'a pas été décelé.

CHAPITRE IV

METABOLISME AEROBIE

DU GLUCOSE

ETUDE DES ECHANGES GAZEUX

— . —

1. INTRODUCTION

Peu d'auteurs se sont intéressés au problème de la mesure des échanges gazeux chez les champignons filamenteux. Nous avons retenu particulièrement le travail de DARBY et GODDARD (1950) sur la respiration de Myrothecium verrucaria, et, pour les Basidiomycètes, celui de NEWCOMB et JENNISON (1962) sur la respiration de Polyporus palustris.

DARBY et GODDARD ont remarqué à juste titre l'extraordinaire variabilité des résultats enregistrés dans ce domaine. Cette variabilité tient probablement, pour une grande part, aux méthodes de mesure. Ainsi nous avons nous-même relevé, pour des Basidiomycètes, que le QO_2 de Merulius lacrymans (GOKSØYR 1958) est environ 10 fois plus faible que celui de Polyporus palustris (NEWCOMB et JENNISON 1962). Dans le premier cas, l'intensité respiratoire est déterminée par analyse du gaz du récipient à culture ; le QO_2 traduit l'intensité du métabolisme respiratoire du mycélium en culture. Dans le deuxième, la mesure est effectuée par une méthode respirométrique classique, dans des conditions standard, et en particulier, dans des conditions optima d'aération. Cette dernière méthode permet de connaître les potentialités du métabolisme aérobie, respiration et fermentation aérobie, de l'espèce étudiée.

Mais on peut constater qu'une grande variabilité subsiste toutefois dans les résultats fournis par une même méthode. Ainsi, dans le cas

de Merulius lacrymans, le QO_2 varie de 10 à 1, et dans celui de Polyporus palustris, de 60 à 19. Les résultats doivent donc dépendre, pour une grande part, non seulement de la méthode de mesure, mais encore de certains facteurs expérimentaux incontrôlés. L'âge de la culture par exemple, semble bien intervenir sur l'intensité respiratoire, si l'on se rapporte aux observations effectuées entre autres par DARBY et GODDARD, par NEWCOMB et JENNISON, sur les espèces déjà citées, et par GENTILE (1954) sur Botrytis cinerea. Pour DARBY et GODDARD, le QO_2 maximum est associé à la phase de croissance active du mycélium et à une variation du pH du milieu de culture. NEWCOMB et JENNISON ont remarqué plus précisément que l'intensité respiratoire maxima correspond au début de la phase d'accélération de croissance. Cependant, aucune explication de la chute ultérieure du QO_2 n'a été donnée. De plus, la variation éventuelle, dans les mêmes conditions, du métabolisme fermentaire aérobic, n'a jamais été testée. Enfin, aucun autre facteur expérimental ordinairement incontrôlé et susceptible d'influencer l'activité métabolique n'a été recherché.

Après une série d'expérimentations préliminaires, nous avons trouvé que 3 facteurs, qui habituellement ne sont pas pris en considération, sont capables de modifier le métabolisme aérobic. Ce sont la plus ou moins grande compacité ou "densité" du mycélium, la durée d'incubation des cultures préexpérimentales et la durée de la mesure manométrique elle-même. Nous définissons en premier lieu, dans ce chapitre, l'action de ces 3 facteurs sur la respiration et sur la fermentation aérobic. Nous discutons ensuite et expliquons cette action. Enfin nous mettons en évidence un phénomène d'adaptation respiratoire réglé par la teneur en oxygène du milieu d'incubation.

Les mesures sont effectuées sur Phlebia radiata. Nous avons également procédé à des observations sur Peniophora crenea, espèce dépourvue de pouvoir fermentaire, dont les échanges gazeux ne relèvent donc que d'un métabolisme respiratoire.

2. MESURE ET VARIATIONS DE L'INTENSITE DES ECHANGES GAZEUX

2.1. INTENSITE DES ECHANGES GAZEUX EN FONCTION DE LA "DENSITE" DU MYCELIUM

La plupart des espèces aptes à croître en milieu submergé ont un mycélium qui se développe naturellement dans la profondeur du liquide. Il n'est pas besoin d'agiter les récipients, tout au moins au début, pour réaliser des cultures submergées. La texture du mycélium ainsi obtenu est alors extrêmement lâche. Par contre, l'agitation même épisodique des cultures conduit à la formation d'un mycélium en "écheveau" plus ou moins dense. La texture est d'autant plus serrée que la vitesse d'agitation est grande et que la croissance est active. Pour des espèces douées d'une croissance rapide, telles les Phlebia, et avec une agitation horizontale de 60 cycles/minute et 6 cm d'amplitude, le mycélium prend la cohérence d'un tissu et se présente sous forme d'amas sphériques ou ovoïdes, devenant creux avec l'âge. Quelques exemples du poids sec et du diamètre des grains mycéliens sont notés ci-dessous :

0,023 mg	1,12 mm	0,174 mg	2,35 mm
0,024	1,25	0,190	2,25
0,070	1,85	0,234	2,37
0,078	1,75	0,240	2,60
0,099	2,20	0,980	3
0,134	2,12	1,086	4

Nous comparons l'intensité des échanges gazeux de mycéliums ayant une texture très lâche et de mycéliums plus denses obtenus dans les conditions d'agitation énoncées ci-dessus. Pour une même espèce, toutes les cultures sont réalisées simultanément et à partir de la même préculture.

2.1.1. Respiration

Nous donnons, dans le tableau VIII le relevé complet d'une mesure de la respiration de Phlebia radiata. La durée de l'expérimentation est de 4 H. Les mycéliums ont 68 H d'incubation.

Nous constatons que, selon la "densité" du mycélium, l'intensité respiratoire peut varier de plus du double. Le QO_2 moyen des mycéliums de texture lâche est en effet de 41 ± 5 alors que celui des mycéliums compacts n'est que de 18 ± 8 , et, pour ces derniers, la variabilité est excessive, puisqu'elle approche $\pm 50 \%$.

Remarquons d'autre part que le volume d'oxygène absorbé par unité de temps par les mycéliums de texture lâche, va en augmentant. Nous reviendrons sur ce phénomène dans un paragraphe ultérieur. Il s'explique en partie par une croissance des mycéliums dans les fioles manométriques. Cette croissance est normale. Nous avons vu, dans le chapitre II, à propos du taux de croissance, que, dans la phase exponentielle, le poids mycélien est multiplié par 1,3 en 4 heures. Par contre, pour les mycéliums compacts, il n'y a pas, en 4 heures, d'augmentation apparente du volume d'oxygène absorbé.

Les résultats obtenus avec d'autres espèces apparaissent dans le tableau ci-dessous.

	Durée incuba- tion en H.	Poids moyen par fiole	QO_2 moyen	
			mycél.compacts	mycél.lâches
<u>Panellus serotinus</u>	200	1,7	14	19
<u>Punctularia tuberculosa</u>	100	2	17	29
<u>Corticium laeve</u>	100	2	11	18
<u>Peniophora crenea</u>	52	2,5	35	46
<u>Corticium ochraceo- fulvum</u>	72	1,7	12	36

Chaque valeur de QO_2 représente la moyenne de 3 ou 4 mesures dont la durée est de 1^H_{30} . Si les écarts enregistrés sont aussi importants pour Corticium ochraceo-fulvum que pour Phlebia radiata, ils le sont beaucoup moins pour les autres espèces. Ce sont, Peniophora crenea mis à part, des espèces à croissance moins rapide.

2.1.2. Fermentation aérobie

Les mycéliums denses de Phlebia radiata, bien que provenant de cultures agitées, c'est-à-dire en principe mieux aérées, ont une fermentation aérobie nettement plus élevée que les mycéliums lâches. Cela ressort clairement des mesures manométriques effectuées avec des fioles sans KOH, comme celles données dans le tableau IX par exemple, pour des cultures mycéliennes de 68 H. En admettant que ces mycéliums, cultivés dans les mêmes conditions que pour la mesure de la respiration, aient aussi, en moyenne, la même intensité respiratoire, le calcul du CO_2 dégagé donne un QCO_2 fermentaire moyen supérieur à 100 pour les uns, inférieur à 20 pour les autres. On se souvient que les Phlebia ont, en anaérobiose, une intensité fermentaire de l'ordre de 100. Ces mycéliums compacts fermentent donc aussi activement en atmosphère ordinaire qu'en atmosphère d'azote.

Remarquons enfin, pour les mycéliums de texture lâche, la variation importante que subit la fermentation aérobie en cours d'expérimentation. Cette variation sera, elle aussi, analysée ultérieurement.

Tabl. VIII Intensité respiratoire de Ph.radiata en fonction de la "texture" du mycélium

	Mycéliums de texture compacte							Mycéliums de texture lâche						
	9	8,5	6,5	6	4,5			17,5	11	18,5	11,5	4,5		
Δ h mm O2 par 1/2 H	7,5	8	6	7	4,5			17,5	12	19	12	4,5		
	8	9	6,5	7,5	4,5			23	14,5	24	14	5		
	9,5	9,5	7,5	7,5	5			27,5	17,5	27,5	17,5	5,5		
	7,5	9	6,5	8	5			28	18,5	30	16,5	6		
	9,5	10	7,5	7,5	5			32	20	33	20	6		
	8,5	9,5	7,5	8	6			35	22	35,5	20,5	7		
	9,5	10	8	7,5	4,5			38	24,5	38	22,5	7		
V. O2 absorbé 4ème H.	22,1	24,4	18,9	18,4	13,2			89	58,6	86,7	53,7	17		
Poids sec par fiole mg	1,06	1,32	1,04	0,70	1,31			1,96	1,48	1,91	1,25	0,48		
Q02 4ème H	21	18	18	26	10			45	39,5	45,5	43	35		
Q02 moyen	18,5							4,1						

2.2. INTENSITE DES ECHANGES GAZEUX EN FONCTION DE LA TAILLE DES MYCELIUMS

Les observations concernent non seulement les mycéliums de texture lâche de Phlebia, mais aussi les mycéliums compacts. Pour les premiers, nous tenions à vérifier que l'intensité des échanges gazeux était bien indépendante de la taille des mycéliums soumis à l'expérimentation. Ceci, évidemment, dans la mesure où le volume du gaz échangé n'est pas limité par sa vitesse de diffusion dans le milieu liquide des fioles manométriques. Nous rappelons que nous avons fixé, une fois pour toutes, par des mesures préliminaires, l'importance des volumes gazeux pouvant être échangés pour la vitesse d'agitation utilisée^(o). (Voir "Techniques manométriques" dans le chapitre I).

Pour les mycéliums compacts, une variation de l'intensité respiratoire en fonction de leur taille pouvait expliquer la variabilité de QO_2 que nous avons constatée précédemment.

2.2.1. Mycéliums de texture lâche

Nous récapitulons dans le tableau X les résultats de mesures manométriques de 1 H 30, effectuées sur plusieurs mycéliums de Phlebia radiata ensemencés simultanément. L'obtention de poids très différents a nécessité deux périodes d'incubation.

Après 52 heures de culture, le QO_2 est de 40 ± 8 alors que le poids des mycéliums soumis aux mesures varie de 0,19 à 1,78 mg.

Pour des poids notablement plus élevés, le QO_2 moyen est plus faible, mais ne varie cependant que de 34 à 26 alors que les poids testés vont de 3 à 8 mg.

Le graphique de la figure 8 montre bien que pour une même période d'incubation, les volumes d'oxygène absorbé restent, dans une large mesure, proportionnels aux poids, et la diminution du QO_2 semble résulter essentiellement de l'allongement de la période d'incubation. Le pourcentage de variation de l'intensité respiratoire, pour chacune des séries de mycéliums n'est pas tellement supérieur à celui enregistré, par exemple par SLONIMSKI pour des levures croissant en milieu bien aéré et pour lesquelles $QO_2 = 82 \pm 10$.

(o) Dans ces mesures, l'augmentation des volumes gazeux échangés était obtenue en augmentant, non la taille, mais le nombre des mycéliums introduits par fiole.

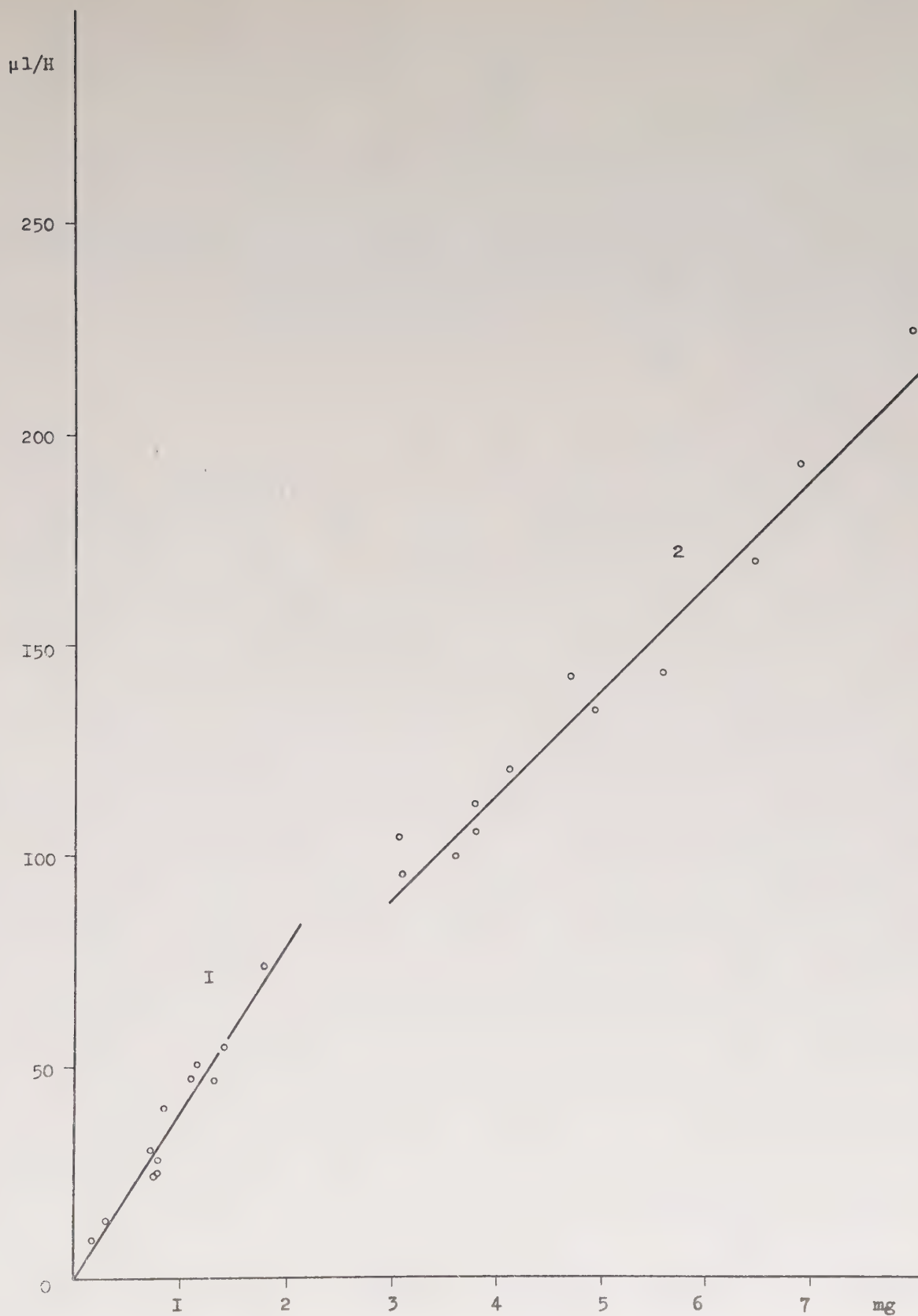


Fig.8 RESPIRATION EN FONCTION DE LA TAILLE DES MYCELIUMS DE TEXTURE LACHE DE PHLEBIA RADIATA

en ordonnée: volume d' O_2 absorbé par heure
 " abscisse: poids sec des mycéliums testés
 1: mycéliums de 52 H
 2: " 90 H

TABLEAU X . Intensité respiratoire de Phlebia radiata en fonction de la taille des mycéliums soumis aux mesures - Mycéliums de texture lâche -

mg Poids sec par fiole (mycel.de 52 H.)	µl O ₂ absor.en 1 H 1/2	QO ₂	QO ₂ moyen	mg Poids sec par fiole (mycél.de 90 H.)	µl O ₂ absor.en 1 H 1/2	QO ₂	QO ₂ moyen
0,19	9,4	48		3,05	104,6	34	
0,34	13,7	40		3,10	95,5	31	
0,73	30,2	41		3,60	100,1	28	
0,75	24,4	32,5		3,80	105,8	28	
0,77	27,8	36		3,80	112,5	29,5	
0,77	24,6	32	40	4,10	120,8	29,5	29
0,83	40,1	48		4,70	143	30,5	
1,09	47,2	43		4,95	135	28	
1,15	50,5	44		5,60	144	26	
1,31	46,4	35,5		6,45	170,5	26,5	
1,40	54,4	39		6,95	193,7	28	
1,78	73,7	41,5		8,05	225,7	28	

2.2.2. Mycéliums compacts

A la différence des précédents, ces mycéliums ont une intensité respiratoire qui diminue progressivement et rapidement, en fonction de leur taille. Nous avons étudié particulièrement cette variation chez Phlebia radiata et Corticium ochraceo-fulvum. De plus, nous avons suivi, simultanément, sur les mêmes mycéliums, la variation de la fermentation aérobique. Nous procédons d'abord à des relevés manométriques en l'absence de KOH, puis les fioles sont ouvertes, et la potasse est ajoutée. Chaque série de mesures dure 1 heure. Les résultats sont récapitulés dans les tableaux XI et XII. Chacun des QO_2 et QCO_2 fermentaires notés représente la moyenne des mesures effectuées sur 6 à 15 mycéliums de poids voisin.

L'intensité respiratoire de Phlebia radiata et de Corticium ochraceo-fulvum, qui est respectivement de 40 et 80 pour des poids testés inférieurs à 1/10 de mg, tombe à 14 et 17 pour des poids de 1 mg et à 8 et 10 pour des poids de 2 mg. Par contre, la fermentation aérobique de Phlebia radiata atteint très rapidement son maximum, 85 - 95, puis reste constante. Pour Corticium ochraceo-fulvum, elle augmente graduellement et ne dépasse pas 60.

Il n'est pas possible d'attribuer la chute importante de l'intensité respiratoire au vieillissement du mycélium. D'une part, nous avons diminué autant que possible l'écart d'incubation entre les mycéliums de faible poids et ceux de poids élevé en utilisant des implants de taille différente. D'autre part, le volume de CO_2 d'origine fermentaire reste, lui, proportionnel au poids, aussi bien pour Phlebia radiata que pour Corticium ochraceo-fulvum. (fig. 9)

Le volume d'oxygène absorbé augmente, en fonction du poids, selon une relation rappelant la variation de la surface d'une sphère en fonction de son volume ; c'est-à-dire que, vraisemblablement, seules les hyphes périphériques respirent alors que les hyphes internes fermentent. Nous avons noté déjà que l'intensité de la fermentation des mycéliums compacts de Phlebia radiata est vraisemblablement aussi forte en atmosphère ordinaire qu'en atmosphère d'azote ; nous le vérifions ici. Cela prouve que la presque totalité de la masse mycélienne est en anaérobiose. Par contre, pour Corticium ochraceo-fulvum, il faudrait admettre que la couche respirante est, soit plus épaisse, soit plus active.

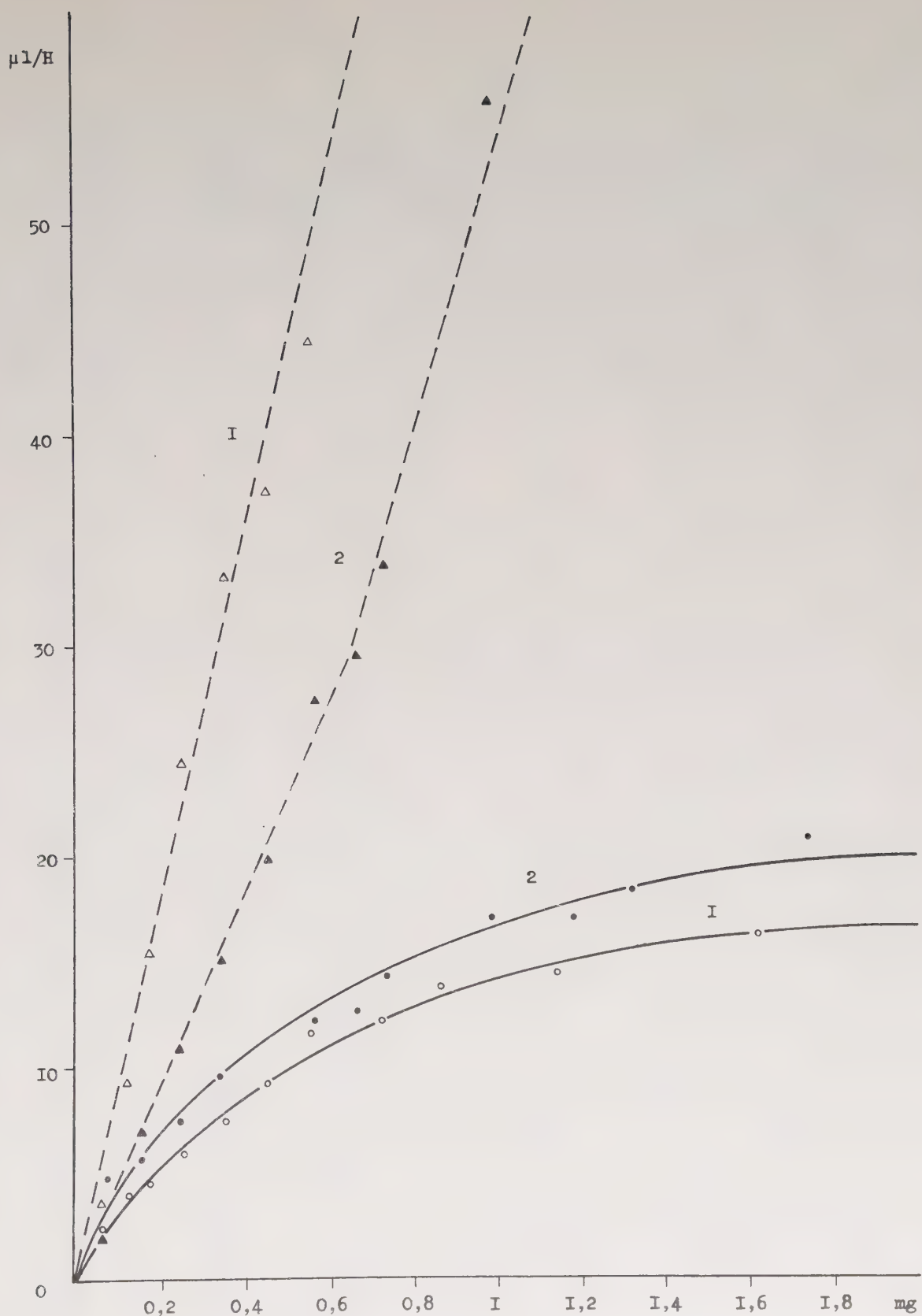


Fig.9 ECHANGES GAZEUX EN FONCTION DE LA TAILLE DES MYCELIUMS DE TEXTURE COMPACTE
 I: PHLEBIA RADIATA
 2: CORTICIUM OCHRACEO-FULVUM

en ordonnée: volumes échangés par heure
 " abscisse: poids sec des mycéliums testés
 trait continu: oxygène
 tirets: gaz carbonique

TABLEAU XI - Intensité respiratoire et intensité fermentaire aérobie de Phlebia radiata en fonction de la taille des mycéliums soumis aux mesures - Mycéliums de texture compacte.

mg Poids sec par fiole	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	Poids moyen	O_2 V. moyen	CO_2 V. moyen	QO_2	QCO_{2f}
0,05	2,3	5,5	0,06	2,4	6,1	40	61,5
0,05	2,3	5,5					
0,05	2,3	5,5					
0,06	2,4	5,5					
0,06	2,4	5,5					
0,07	2,5	7,2					
0,07	2,5	7,2					
0,07	2,5	7,2					
0,08	2,5						
0,10	2,8	11,2	0,12	4	13,4	33	78,5
0,10	2,8	11,2					
0,11	3,5	12					
0,12	5,7	12,1					
0,12	2,9	12,9					
0,14	3,6	15,1					
0,15	6,7	19,2					
0,16	4,4	13,5	0,17	4,5	20,1	26,5	91,5
0,16	4,4	13,4					
0,17	2,4	15,1					
0,17	3,7	26,7					
0,17	3,8	15,7					
0,18	3,6	17,7					
0,18	7	34,2					
0,19	2,4	20,9					
0,19	8,7	23,7					
0,21	3,7	17,7	0,25	5,9	27,5	23,5	86,5
0,21	4,9	16,9					
0,21	3,5	19,1					
0,22	4,3	30,3					
0,23	11,7	39,3					
0,24	4,8	24,7					
0,25	4,7	31,1					
0,25	8,6	25,1					
0,26	4,7	20,3					
0,27	4,8	27,7					
0,28	7,3	29,7					
0,28	4,9	18,3					
0,28	6,6	56,6					
0,28	8,9	29,9					
0,28	5	26,9					

0,30	5,9	29,6	0,35	7,5	40,9	21,5	95,5
0,32	9	43,8					
0,32	8,5	40					
0,32	8,3	29,9					
0,32	5,5	29,8					
0,34	8,2	48,2					
0,34	11,5	55,3					
0,35	6,4	47,7					
0,36	7,4	33,5					
0,37	5,3	44,1					
0,37	8,3	38,3					
0,38	6,4	38,2					
0,39	8,1	57,9					
0,39	6,1	36,6					
0,41	7,7	46	0,45	9,3	46,8	21	83
0,43	8,3	42,4					
0,44	13,3	52					
0,45	7,2	35,6					
0,45	9,5	48,9					
0,47	10,6	40,2					
0,49	8,5	62,6					
0,50	7	48,3	0,55	11,6	56,2	21	81
0,51	12,7	51,7					
0,52	12,6	66,5					
0,52	10,5	35,8					
0,55	7,6	64,1					
0,56	12	48					
0,58	12,8	53,8					
0,59	15,7	60,6					
0,59	13,4	77,5					
0,60	11,9	65,5	0,72	12,2	74,3	17	86
0,61	13,9	56,4					
0,70	13,9	90,2					
0,72	12	71,6					
0,72	12,6						
0,74	9,1	65,7					
0,77	8,9	85,9					
0,78	12,3	71,3					
0,79	16,3	88,3					
0,76	10,8						
0,80	16,1	98,8	0,86	13,8	86,1	16	84
0,80	11	87,6					
0,84	11,1	58,5					
0,86	15,9	94,3					
0,90	12,3	81,5					
0,90	14,7	94,3					
0,91	13,2						
0,92	16	88					

1,02	9,4	87,7					
1,11	16,9	109,5					
1,13	17,7	131,9					
1,16	8,5	67,8					
1,16	21,4	129,6	1,14	14,5	116	13	89
1,17	16,5	176,8					
1,25	11,3	108,7					
1,32	16,4						
1,35	10,5	117,8					
1,62	21,2						
1,63	20,7	139,3					
1,65	10,4	131,2	1,62	16,3	146	10	80
1,77	23,6	183,1					
1,83	14,5	162,4					
1,80	13,2	141,6					
2,12	17,8	186					
2,20	16,4	190,3					
2,40	17	180,1	2,48	20,8	210	8,5	76
2,40	34,1						
2,80	13,9	236,5					
2,97	25,5	256,6					

TABLEAU XII - Intensité respiratoire et intensité fermentaire aérobie de Corticium ochraceo-fulvum en fonction de la taille des mycéliums soumis aux mesures. Mycéliums de texture compacte.

mg Poids sec par fiole	µl O ₂	µl CO ₂	Poids moyen	O ₂ V.moyen	CO ₂ V.moyen	QO ₂	QCO ₂ f
0,04	5,3	7,3	0,06	4,8	6,8	80	33
0,05	4,4	7,8					
0,05	3,6	2,9					
0,06	3,7	6,4					
0,07	4,5	7,5					
0,08	6	8					
0,08	5,4	8					
0,12	7,7	11,3	0,15	5,7	12,7	38	46,5
0,12	5,1	11,5					
0,13	5,6	12,4					
0,15	5,3	12					
0,16	8,3	17,9					
0,16	3,6	10,2					
0,16	4,8	12,3					
0,19	5,4	14,3					
0,21	7,2	12,2	0,24	7,5	18,5	31	46
0,21	11,1	20,2					
0,23	8,6	18,7					
0,24	8,4	19,1					
0,24	9,3	20,3					
0,26	4,8	19,2					
0,29	3,1	19					
0,30	9,4	18,6	0,34	9,6	24,7	28	44
0,31	10,8	17,8					
0,31	11,9	27,2					
0,32	11,7	24,3					
0,33	8,2	19,2					
0,33	5,2	22					
0,36	10,6	30,8					
0,36	10,2	34,8					
0,36	8,9	23,7					
0,38	8,6	22					
0,39	10,1	30,6					
0,40	12,9	33,4	0,45	9,4	29,3	21	44
0,42	9,6	27,3					
0,43	8	23,7					
0,44	9,1	27,3					
0,45	6,4	29,6					
0,45	6,6	25,4					
0,46	5,3	26,9					
0,47	12	32,8					
0,48	17,6	41,1					
0,49	8,9	25,5					

0,52	13	32,4					
0,55	21,6	52,1					
0,56	9,8	42,6					
0,56	10,5	40,6	0,56	12,2	39,8	21,5	49,5
0,58	12,1	37,9					
0,59	6,2	32,8					
0,63	11,7	46,8					
0,66	17,4	44,5					
0,67	10,6	36,1	0,66	12,6	42,3	19	45
0,68	10,6	42,1					
0,70	13,4	53,3					
0,71	13,9	51,2					
0,71	10,2	52,9					
0,72	18,4	58,8	0,73	14,3	48,3	19,5	46,5
0,77	5,9	25,9					
0,78	24,3	47,8					
0,80	17,8	71,3					
0,95	18,3	82,2					
0,98	13,4	55,6					
1	21,3	71,2	0,98	17,1	73,1	17	53,5
1,03	20,1	86,2					
1,05	15,3	81,3					
1,05	13,8	64,1					
1.10	20,1	83					
1,10	8,1	81					
1,17	11,8	71,1					
1,20	27,8	132,9	1,18	17	93,1	14,5	65,5
1,25	13,8	91,1					
1,25	20,5	98,6					
1,30	25,9	154,1					
1,30	15,2	87,6					
1,30	10	108,3					
1,30	22,9	85,6	1,32	18,4	99,9	14	61,5
1,30	12,9	68					
1,30	15,3	80,1					
1,35	24,5	117,4					
1,40	20,5	99,5					
1,50	11,2	76,3					
1,50	16,7	87,8					
1,73	12,7	112,4	1,74	20,8	132,2	12	59
1,95	37,1	193,5					
2	26,7	147,8					

2.3. INTENSITE DES ECHANGES GAZEUX EN FONCTION DE LA DUREE DES CULTURES

Nous avons vu, dans le paragraphe précédent, que l'intensité respiratoire des mycéliums de texture très lâche est indépendante de leur taille et que, par contre, l'allongement de la période d'incubation semble jouer un rôle déterminant. Nous étudions ici, d'une façon systématique, la variation de l'intensité des échanges gazeux en fonction de cette durée d'incubation, et, corrélativement, en fonction de la croissance.

Les espèces testées sont Phlebia radiata et Peniophora crenea. Pour la première, nous suivons simultanément la respiration et la fermentation aérobie ; la deuxième, dépourvue de pouvoir fermentaire, nous permet de contrôler une variation éventuelle du quotient respiratoire.

Pour chaque période d'incubation considérée, 12 mycéliums sont utilisés, 6 pour l'oxygène et 6 pour le gaz carbonique. Pour ces derniers, les volumes de CO_2 rejeté sont calculés en admettant pour chaque mycélium une intensité respiratoire égale à la moyenne mesurée sur les 6 autres.

Les résultats sont récapitulés dans les tableaux XIII et XIV et par les graphiques des figures 10 et 11. Nous n'avons noté le poids des cultures mycéliennes de Phlebia radiata, dont nous connaissons déjà la cinétique de la croissance dans ces conditions, que pour les périodes d'incubation les plus brèves.

On constate, pour ces deux espèces, une chute d'abord très importante, puis moindre ou nulle, de l'intensité respiratoire en fonction de la durée d'incubation. Pour Peniophora crenea, le QO_2 tombe de 46 à 30 en 24 H et seulement de 30 à 26 dans les 24 heures suivantes. La diminution de l'intensité respiratoire est la plus sensible dans la phase active de la croissance, et surtout au début de cette phase ; ensuite, c'est-à-dire pendant la phase de ralentissement, elle est beaucoup plus faible, le QO_2 ne diminue plus que de 6 unités en 96 heures. Pour Phlebia radiata, le QO_2 passe de 37 à 12 pendant les 72 heures correspondant à peu près à la phase active de la croissance, il se relève légèrement ensuite, du fait de l'apparition d'un mycélium partiellement aérien.

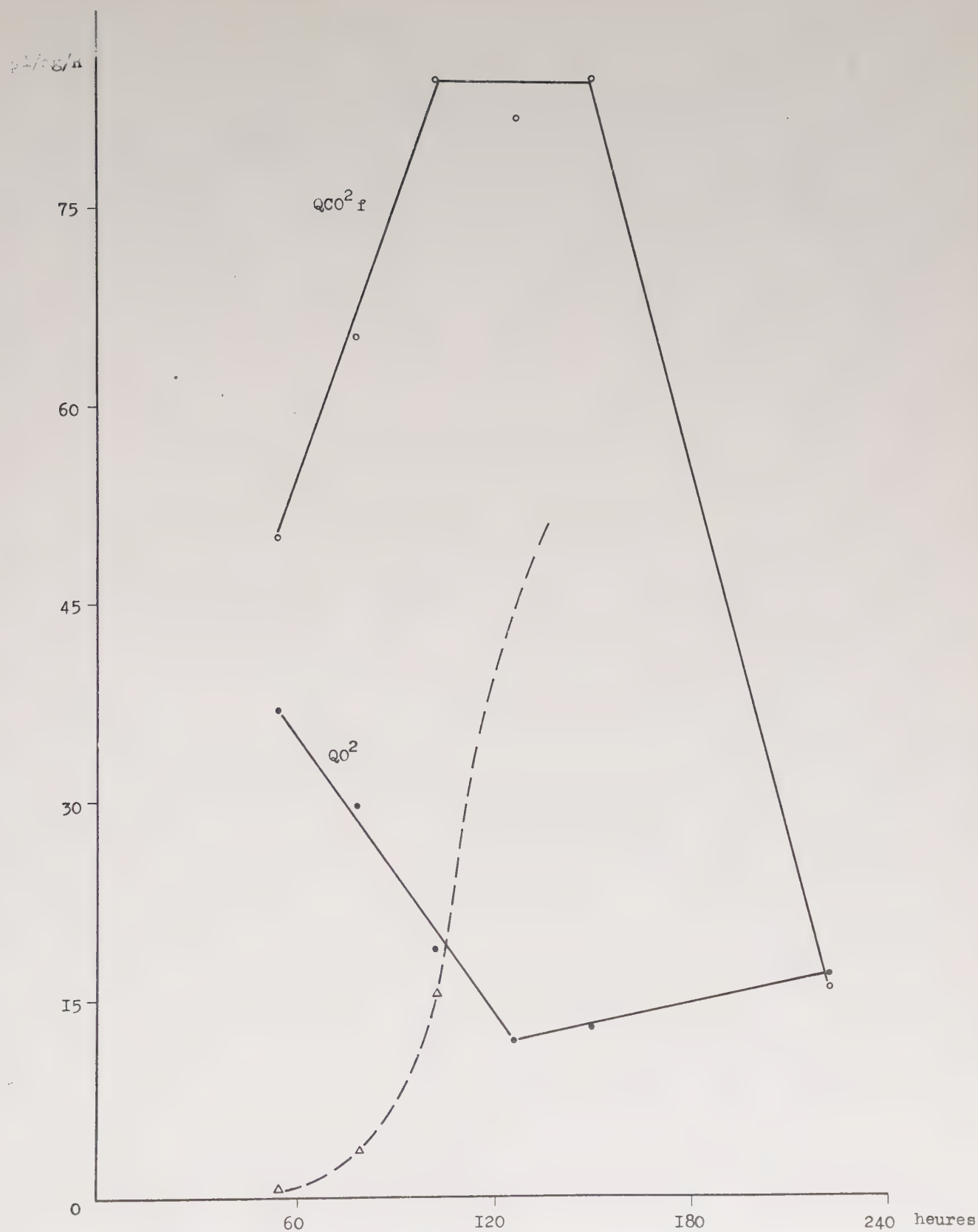


Fig.10 INTENSITE DES ECHANGES GAZEUX EN FONCTION DE LA DUREE DES CULTURES DE PHLEBIA RADIATA

(en tirets: courbe de croissance)

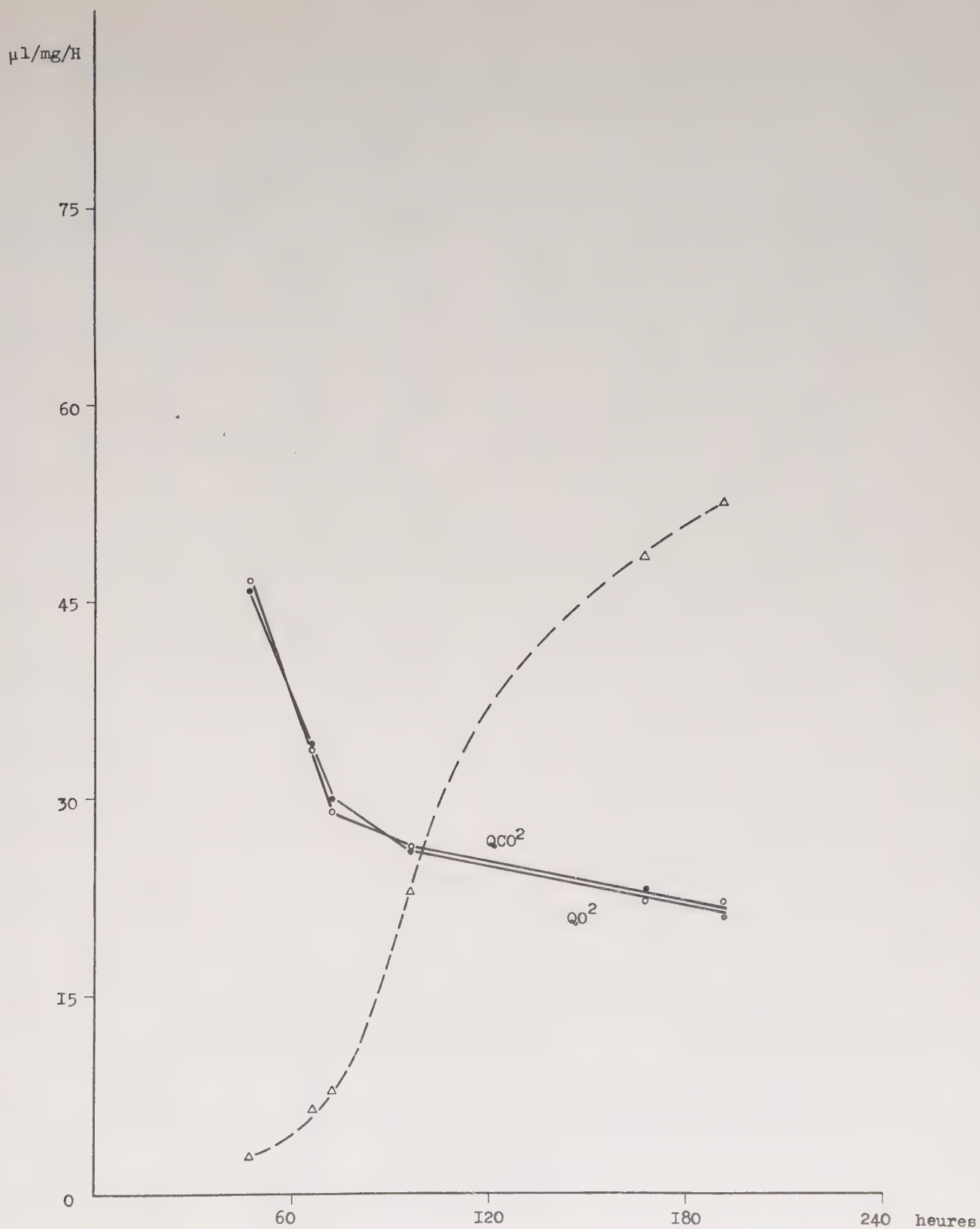


Fig.II INTENSITE DES ECHANGES GAZEUX EN FONCTION DE LA DUREE DES CULTURES DE PENIOPHORA CREMEA

(en tirets: courbe de croissance)

TABLEAU XIII - Intensité respiratoire et intensité fermentaire aérobie de Phlebia radiata en fonction de la durée d'incubation des cultures.

Durée incuba. en H.	Poids sec moyen mg	Respiration			Fermentation aérobie		
		P.s.par fioule mg	QO ₂	QO ₂ moyen	P.s.par fioule mg	QCO ₂ f	QCO ₂ f moyen
54	0,43	0,19	48,3	36,9	0,29	53,1	50
		0,26	34,6		0,34	69,1	
		0,34	40		0,33	41,2	
		0,49	33,6		0,33	36	
		0,64	33,2		0,66	47,8	
		0,35	31,7		0,57	53	
78	2,40	1,16	33,3	29,8	1,02	74,6	65,3
		1,50	28,4		1,30	59,6	
		1,21	37,8		2,07	77,2	
		1,78	30,2		2,55	64,6	
		1,93	24,7		3,11	60,7	
		2,43	24,7		1,96	55,5	
102	10,40	2,15	18,2	18,8	3,20	87,9	85,1
		3,80	13,2		1,35	72,3	
		4	14,2		4,60	87	
		4,75	31,7		2,60	101	
		3,45	18,3		3,20	87,6	
		3,85	16,5		3,75	81,1	
126		1,20	16,1	12	1,10	74,9	81,9
		1,75	11,1		1,15	68,8	
		1,20	11,4		1,40	93,7	
		1,05	12,9		1	82,3	
		1,80	11,9		1,25	80,1	
		1,50	8,7		1,05	92	

150	2,20	9,9	13	1,70	104	85
	2,20	17,1		1,60	103	
	1,40	12		1,10	101	
	1,40	15,5		1,50	86	
	1,80	-		1,40	94	
	2,60	11,3		1,50	99	
222	2,10	14,2	17	3,20	23,7	16,1
	3,70	19,1		3,05	23,6	
	3,80	20		3,65	18	
	3,65	17,2		4,35	16,7	
	2,40	21		4,70	21,9	
	3,85	13,6		5,10	16,1	

TABLEAU XIV - Intensité respiratoire de Peniophora cremea en fonction de la durée d'incubation des cultures.

Durée incub. en H.	Poids sec moyen mg	O ₂			CO ₂		
		P.s.par fioule mg	QO ₂	QO ₂ moyen	P.s.par fioule mg	QCO ₂	QCO ₂ moyen
47	1	0,66	41	46,1	1,05	50	46,5
		0,96	46,5		1	46,3	
		1,50	49,6		1,90	46,8	
		0,75	45,2		1	44,3	
		0,65	46,1		1,10	44,8	
		1,45	48,2		1,20	47,2	
66	4,4	2,15	40,4	33,9	2,35	35,5	34,2
		2,90	31,9		3,30	35,8	
		7,25	33		3,60	35	
		4,40	32,4		4,70	30,6	
		3	34,3		2,70	34,7	
		3,80	31,5		3,85	34,1	
72	5,2	2,70	33,5	30,2	1,45	28	28,7
		2,15	37,1		1,60	29	
		3,10	28,6		4,15	29,1	
		3	25,4		2,85	28,8	
		4,45	24,3		4	28,2	
		3,40	32,4		2,50	29,4	
96	15,35	3,15	18,2	26,5	3,80	27,1	26,5
		2,20	26,4		2,70	25,3	
		5	26		4	27,5	
		4,60	25,5		3,75	26,2	
		3,55	29,4		5	26,8	
		2,50	33,5		5,80	26,2	

168	32,5	3,60	23,4	23,4	4,75	22,5	22,3
		3,50	21,4		4,20	22,2	
		3,35	26,1		6,05	22,5	
		3,45	25,7		6,70	22,2	
		5,20	24,9		7,25	21	
		7,70	18,9		9,40	23,6	
192	35,3	7,40	16,6	20,8	8,30	23,6	22,4
		7,95	18,9		5,20	22,5	
		6,55	18,4		5,40	22,9	
		4,65	23,9		4,90	22,1	
		5	22,7		5,70	21,4	
		4,90	24,2		4,75	20,9	

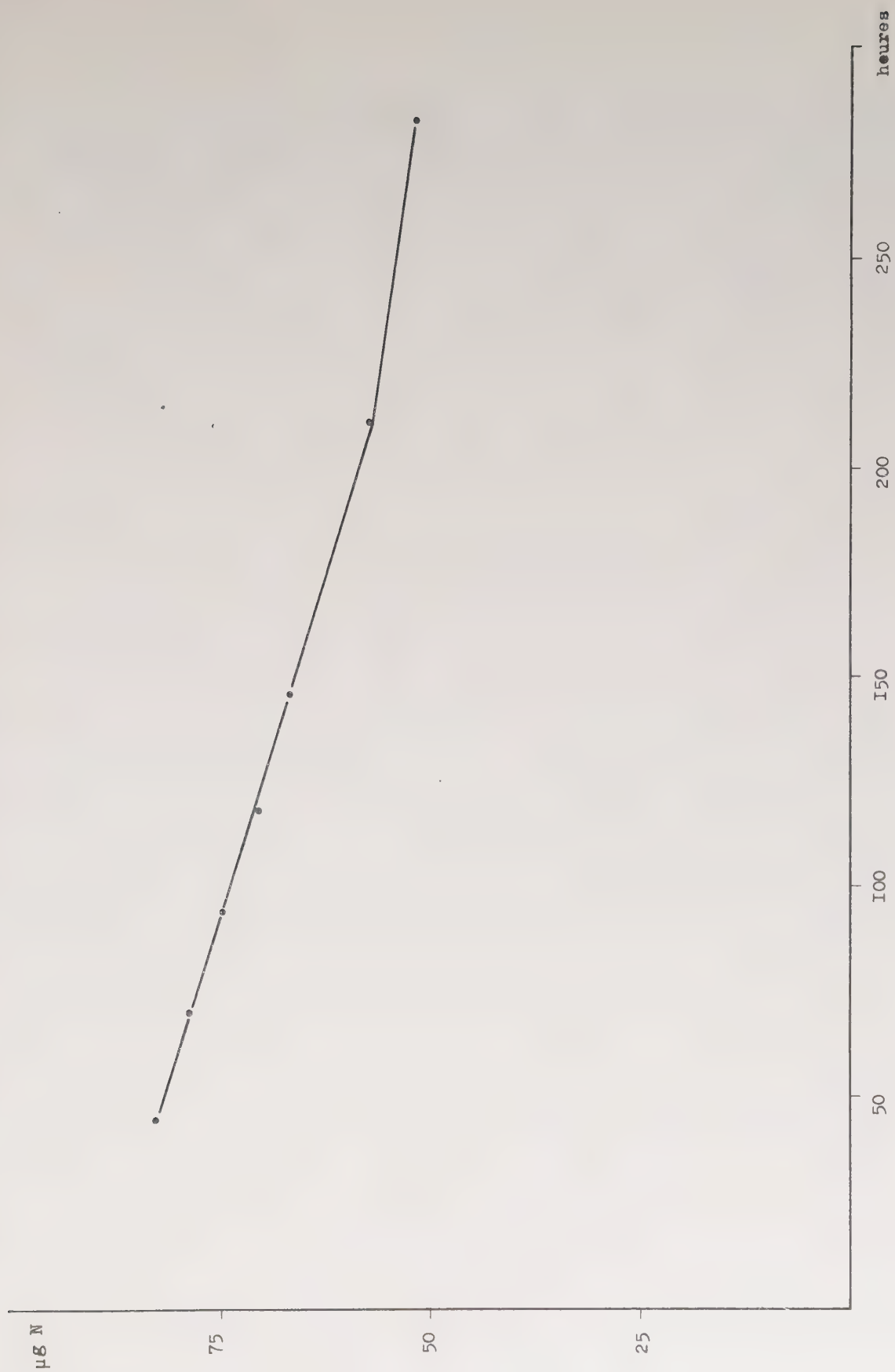


Fig. 12 TENEUR DU MYCELIUM DE PHLEBIA RADIATA EN AZOTE ORGANIQUE
en ordonnée: µg d'azote par mg de poids sec

La chute la plus importante de l'intensité respiratoire ne peut donc être attribuée à un vieillissement du mycélium ou à une accumulation d'hyphes mortes, puisqu'elle survient dans la phase active de la croissance et même au début de cette phase.

D'autre part, alors que pour Peniophora crenea le $Q.R.$ reste bien toujours égal à 1, pour Phlebia radiata le volume du CO_2 rejeté par unité de poids augmente considérablement dans le même temps où l'intensité respiratoire diminue. Cela correspond à une intensification de la fermentation aérobie. Le QCO_2 fermentaire, qui est de 50 au début de la phase active passe à 85 à la fin de cette phase. Il n'y a donc pas, pour cette espèce un ralentissement, mais un changement du métabolisme qui devient de plus en plus anaérobie. D'ailleurs, la diminution de la teneur du mycélium en azote organique, pendant la croissance, dans les conditions d'expérimentation, est très faible et régulière (fig. 12) et ne peut expliquer la chute du QO_2 .

Le facteur en cause, dans ces variations affectant l'intensité des échanges gazeux au cours de la croissance, n'est donc pas un affaiblissement de l'activité métabolique du fait du vieillissement, mais plus exactement, un ralentissement du métabolisme aérobie par suite d'une diminution de l'oxygénation des hyphes. On voit d'ailleurs (fig. 10) l'intensité fermentaire aérobie décroître très rapidement dès qu'apparaît et augmente la fraction aérienne du mycélium.

2.4. VARIATION DE L'INTENSITE DES ECHANGES GAZEUX AU COURS DES MESURES MANOMETRIQUES

Nous avons remarqué déjà (§ 2.1.1 et 2.1.2), que les volumes d'oxygène absorbé et de CO_2 fermentaire rejeté par les mycéliums de texture lâche de Phlebia radiata, varient régulièrement et de façon contraire en cours d'expérimentation. Nous étudions cette double variation avec plus de précision par des mesures manométriques délibérément longues.

Nous donnons, à titre d'exemple, dans les tableaux XV et XVI les résultats de 6 séries de mesures. Les relevés manométriques sont effectués toutes les 1/2 heures pendant environ 8 H. Les volumes d'oxygène et de gaz carbonique notés dans chaque série de mesures sont calculés à partir de 2 mycéliums différents, mais de poids très voisin, et rapportés ensuite à un même poids sec.

2.4.1. Variation du Q.R.

On constate, d'une part, que le volume d'oxygène consommé par un mycélium donné augmente à chaque mesure, ce qui peut s'expliquer uniquement par la croissance dans les fioles ; mais, d'autre part, le volume du CO_2 d'origine fermentaire diminue, ce qui implique, quelle que soit la croissance, un changement dans le métabolisme qui devient de plus en plus aérobique. La variation du Q.R., qui permet de suivre ce changement de métabolisme apparaît nettement sur les graphiques correspondants, comme par exemple, ceux des figures 13 et 14 se rapportant au tableau XVI.

Ce changement de métabolisme s'effectue en moyenne pendant les cinq premières heures d'expérimentation. Le Q.R. qui, après une 1/2 heure de mesure, est de l'ordre de 2,5 pour des mycéliums de 1 mg et de 3 à 3,5 pour des mycéliums de plus de 2 mg, tombe, après 5 heures, à 1,2 pour les premiers, et à 1,4 - 1,7 pour les autres. Ce quotient respiratoire est ensuite susceptible d'augmenter de nouveau. Nous reviendrons ultérieurement sur cette dernière remarque.

Tabl. XV Changement de métabolisme par Ph. radiata au cours des mesures manométriques

Temps en H	Poids sec final = 0,87				Poids sec final = 1				Poids sec final 4,05			
	ul par 1/2 H			Q.R.	ul par 1/2 H			Q.R.	ul par 1/2 H			Q.R.
	O2	CO2	CO2 f		O2	CO2	CO2 f		O2	CO2	CO2 f	
1/2	6,8	13,8	7	2	8,2	20,3	12,1	2,47	45,9	117,4	71,5	2,55
1	7,7	17,4	9,7	2,25	8,8	20,8	12	2,36	41,3	114,6	73,3	2,77
1 1/2	8,6	16,3	7,7	1,89	10	19,5	9,5	1,95	48,5	115,8	67,3	2,38
2	6,8	12,5	5,7	1,83	10,6	18,8	8,2	1,77	53	110	57	2,07
2 1/2	10,3	14,8	4,5	1,43	11,1	18,8	7,7	1,69	60,2	114,4	54,2	1,90
3	9,4	14,5	5,1	1,52	11,1	16,7	5,6	1,50	66,7	117,3	50,5	1,75
3 1/2	11,1	16,4	5,3	1,46	15,3	21,3	6	1,39	72,1	124	51,9	1,71
4	11,1	15,1	4	1,36	15,3	20,6	5,3	1,34	80	131,9	51,9	1,64
4 1/2	11,1	15,1	4	1,36	15,8	21,3	5,5	1,34	84,5	134,8	50,2	1,59
5	14,6	17,6	3	1,20	18,2	23	4,8	1,26	91,1	145,7	54,6	1,59
5 1/2	14,6	19,6	5	1,34	18,8	24,6	5,8	1,30	102,2	160,9	58,7	1,57
6	16,3	19,4	3,1	1,19	21,1	25,7	4,6	1,21	102,8	166	63,2	1,61
6 1/2	16,3	20,1	3,8	1,23	20,6	25,7	5,2	1,24	109,4	184,1	74,7	1,68
7	18,8	21,6	2,8	1,14	21,7	25,7	4	1,18	110	190,5	80,5	1,73
7 1/2	18,8	23	4,2	1,22	23,5	28,4	4,9	1,20	118,6	213,1	94,5	1,79
8	21,4	25	3,6	1,16	25,1	31,5	6,4	1,25	112	215,2	103,2	1,92
8 1/2	23,1	26,3	3,2	1,13	24,1	29,7	5,6	1,23				

Tabl.XVI Changement de métabolisme par Ph. radiata au cours des mesures manométriques
(suite)

Temps en H	Poids sec final = 2,31				Poids sec final = 2,53				Poids sec final = 2,69			
	µl par 1/2 H				µl par 1/2 H				µl par 1/2 H			
	O2	CO2	CO2 f	Q.R.	O2	CO2	CO2 f	Q.R.	O2	CO2	CO2 f	Q.R.
1/2	17	59,6	42,6	3,50	21,1	62,9	41,8	2,98	23,3	77,2	53,9	3,33
1	21,7	49,3	27,6	2,27	26,2	62,2	36	2,37	25,8	81,4	55,6	3,15
1 1/2	23,5	64,7	41,2	2,75	27,5	62,6	35,1	2,27	30,7	80,6	49,9	2,62
2	27	58,8	31,8	2,17	32,6	60,1	27,5	1,84	31,5	78,1	46,6	2,47
2 1/2	28,7	60	31,3	2,09	33,9	61,6	27,7	1,81	38,2	84,2	46	2,20
3	30,5	59,9	29,4	1,96	35,2	60,3	25,1	1,71	40,7	84,2	43,5	2,06
3 1/2	25,2	51,8	26,6	2,05	42,9	69,7	26,8	1,62	44,9	87,5	42,6	1,94
4	38,1	67,1	29	1,76	44,8	67,8	23	1,51	48,1	88,2	40,1	1,83
4 1/2	51	82,3	31,3	1,61	47,4	70,7	23,3	1,49	51,5	92,7	41,2	1,80
5	44	74,4	30,4	1,69	51,2	75,7	24,5	1,47	53,2	94	40,8	1,76
5 1/2	43,4	71	27,6	1,63	55	78,6	23,6	1,42	58,1	98,8	40,7	1,70
6	49,3	79,6	30,3	1,61	61,4	84,5	23,3	1,37	61,5	101,2	39,7	1,64
6 1/2	51	81,6	30,6	1,60	58,9	80,3	21,4	1,36	65,6	107,2	41,6	1,63
7	51	88,5	37,5	1,73	57,6	81	23,4	1,40	66,4	105,4	39	1,58
7 1/2	57,5	96,7	39,2	1,68	74,2	99	24,8	1,33	73,1	115,7	42,6	1,58
8	52,2	91,4	39,2	1,75	70,4	92,6	22,2	1,31	72,3	112,6	40,3	1,55
8 1/2	56,3	104,6	48,3	1,85	78,1	106,9	28,8	1,36				

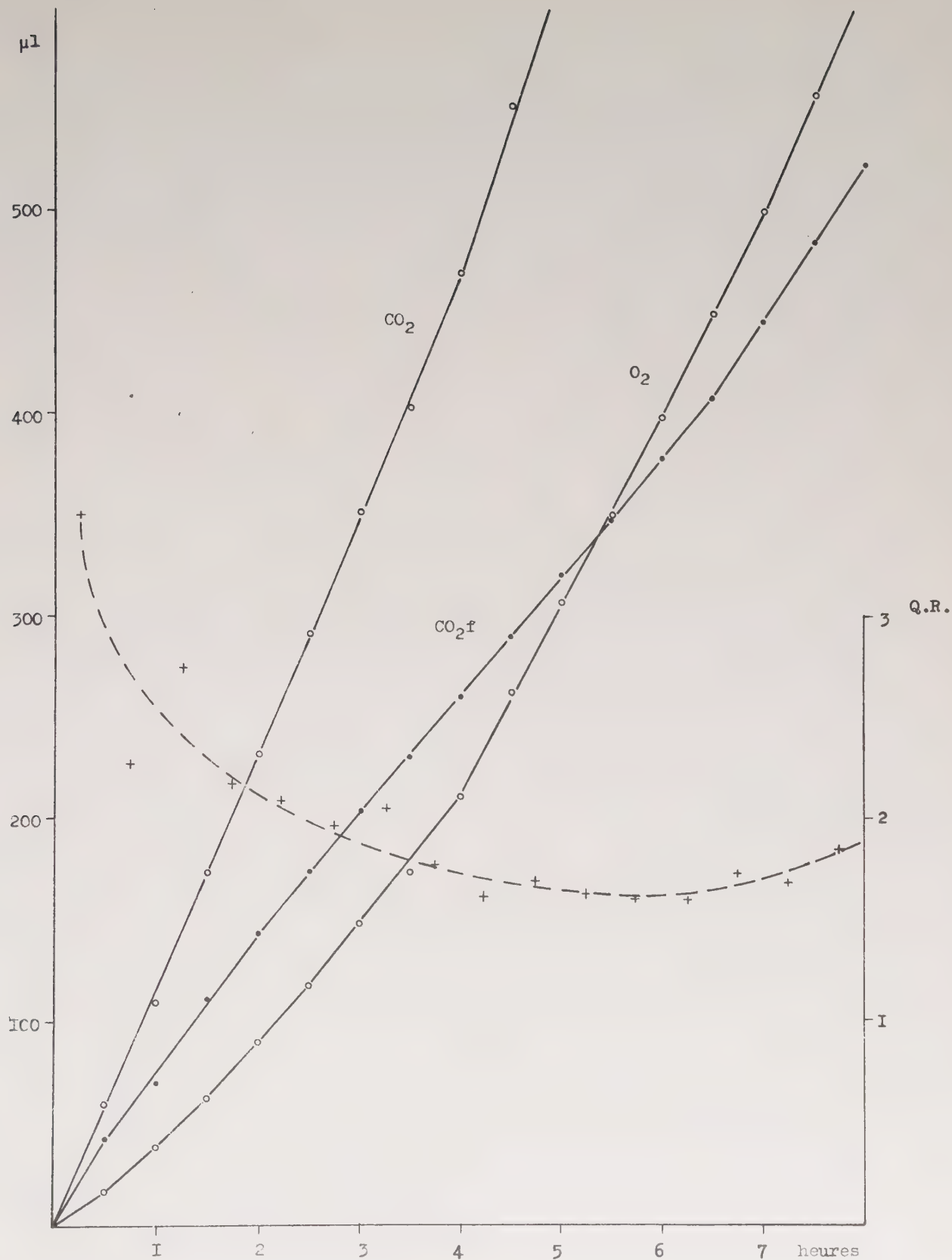


Fig.13 MODIFICATION DU METABOLISME DE PHLEBIA RADIATA
AU COURS DES MESURES MANOMETRIQUES

(poids sec: 2,3 mg)

trait continu: v. gazeux échangés en f. du temps

tirets: variation du Q.R.

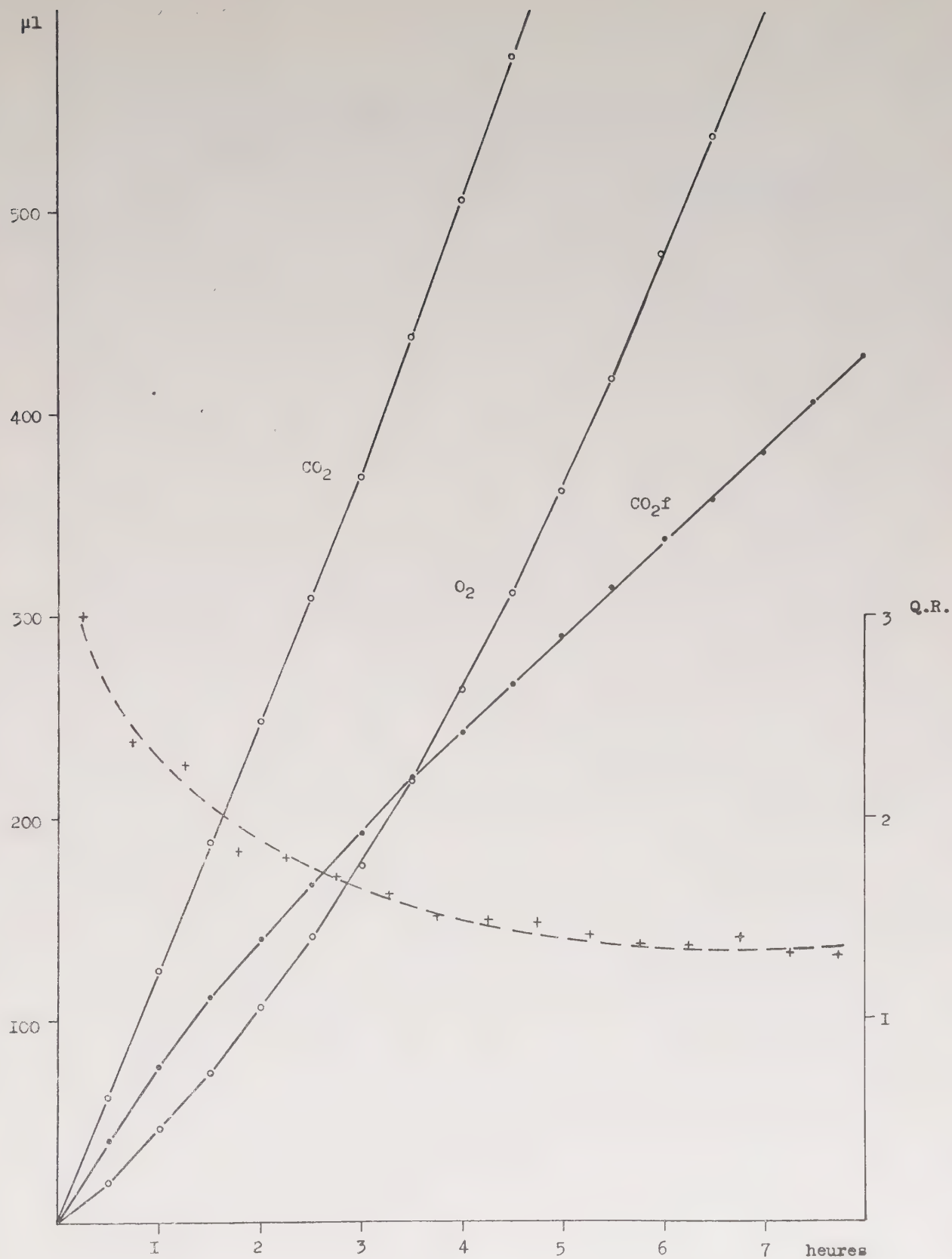


Fig.14 MODIFICATION DU METABOLISME DE PHLEBIA RADIATA
AU COURS DES MESURES MANOMETRIQUES

(poids sec: 2,5 mg)

trait continu: v. gazeux échangés en f. du temps

tirets: variation du Q.R.

2.4.2. Evaluation quantitative du phénomène

En tenant compte de la croissance survenue dans les fioles pendant la durée de l'expérimentation, il est possible de calculer l'intensité respiratoire et l'intensité fermentaire initiale, et de juger, en première approximation, si la diminution de la fermentation s'accompagne éventuellement d'une intensification de la respiration. Nous avons vu, dans le chapitre II (§ 2.3), que le taux de la croissance k est de 1,6 pour une période de 24 heures, dans la phase active d'allure exponentielle, c'est-à-dire quand la croissance n'est apparemment limitée par aucun facteur. Le taux peut être considéré comme étant le même dans les fioles du respiromètre. En posant $\log_e \frac{P}{P_0} = k dt$, on trouve que, en 8 H, le poids initial est multiplié par 1,7. Le poids des mycéliums, en fin d'expérimentation est connu par pesée. Nous constatons, par les résultats récapitulés dans le tableau XVII, que l'intensité respiratoire augmente nettement en cours d'expérimentation, le QO_2 est en moyenne multiplié par 1,75. Nous remarquons d'autre part, que si l'augmentation de l'intensité respiratoire est uniforme, quelle que soit la taille des mycéliums, la diminution de l'intensité fermentaire, par contre, est d'autant plus importante que le poids de la culture mycélienne expérimentée est faible.

2.4.3. Contrôle expérimental de l'activation respiratoire

Nous avons tenu à contrôler d'une façon effective, cette variation de l'intensité respiratoire, la valeur des résultats précédents reposant sur l'exactitude du taux de la croissance dans les fioles, taux admis a priori. Nous procédons, pour cela, à l'expérimentation suivante : 12 mycéliums provenant d'une même série de cultures sont introduits dans les fioles du respiromètre. Six de ces fioles sont agitées pendant 4 heures, les 6 autres, placées également dans le bain-marie de l'appareil, sont laissées au repos. Ensuite, il est procédé aux mesures de respiration, pendant 1 heure. A l'issue de l'expérimentation, le QO_2 moyen des mycéliums non préalablement soumis à l'agitation est de 25, alors que celui des autres est de 47, (tableau XVIII) ; le rapport entre les deux intensités respiratoires est de 1,9 environ.

TABLEAU XVII - Variation de l'intensité respiratoire et de l'intensité fermentaire aérobie de Phlebia radiata au cours de mesures manométriques de 8 heures.

Poids sec final mg	0,87	1	2,31	2,53	2,69	4,05
Poids sec initial mg (par calcul)	0,50	0,60	1,35	1,50	1,60	2,40
QO ₂ final	51	49	47	59	54	57
QO ₂ initial	29	28	29	31	31	36
QCO ₂ f final	8	12	38	20	31	49
QCO ₂ f initial	51	49	47	59	54	57
$\frac{QO_2 \text{ final}}{QO_2 \text{ initial}}$	1,75	1,75	1,62	1,90	1,74	1,58

TABLEAU XVIII - Intensité respiratoire de Phlebia radiata après incubation préalable en milieu agité.

4 heures d'agitation préalable				10 minutes d'agitation préalable			
Poids sec final mg	μl O ₂	QO ₂	QO ₂ moyen	Poids sec final mg	μl O ₂	QO ₂	QO ₂ moyen
1,34	50	37,3	47	2,22	51,8	23,3	25
2,21	118,9	53,7		2,19	56,1	25,6	
1,65	80,6	48,8		1,61	48,4	30,1	
2,08	104,3	50,1		1,53	35,6	23,2	
1,32	67,2	50,9		1,92	44,5	23,1	
1,27	52,9	41,6		2,09	53,1	25,4	

2.5. DISCUSSION. FACTEURS RESPONSABLES DES VARIATIONS

2.5.1. Concentration en oxygène au niveau des hyphes

Mycéliums denses provenant de cultures agitées

Quand il s'agit d'une suspension de microorganismes, l'agitation plus ou moins active des récipients à culture, (ainsi que des fioles du respiromètre), assure une vitesse de diffusion de l'oxygène suffisante pour qu'elle ne limite pas la respiration. Pour les mycéliums, il en va différemment. Il s'agit d'une agglomération d'hyphes formant une masse dont l'ensemble est agité. Le déplacement des hyphes les unes par rapport aux autres est faible ; si la réoxygénation du milieu entourant la masse mycélienne est assurée, celle du liquide séparant les hyphes l'est beaucoup moins, et d'autant moins que la texture du mycélium est compacte. On conçoit que, selon le degré de compacité de la masse mycélienne, la vitesse de diffusion de l'oxygène au sein de cette masse soit variable et que le métabolisme en soit affecté.

Si la texture est très lâche, la vitesse de diffusion de l'oxygène ne limite apparemment pas, ou peu, l'intensité de la respiration, puisque le QO_2 reste le même, avec une variabilité acceptable, pour des mycéliums de poids différents. Mais si la texture est très compacte, comme celle des Phlebia après agitation des récipients à culture, cette vitesse de diffusion est insuffisante, et très rapidement la masse mycélienne formée est en anaérobiose partielle. L'intensité de la respiration et de la fermentation aérobie n'est à peu près équivalente à celle des mycéliums de texture lâche que si le poids des grains mycéliens n'excède pas 0,06 mg, c'est-à-dire si leur diamètre ne dépasse pas 1,5 mm.

Nous avons remarqué (§ 2.4.1), au cours des expérimentations manométriques de longue durée, que le Q.R., après avoir progressivement diminué, remontait parfois plus ou moins. Nous attribuons cela à une mise en "écheveau" plus ou moins compact des mycéliums, par suite de l'agitation à laquelle ils sont soumis dans les fioles, ce qui a pour conséquence de ralentir la diffusion de l'oxygène et de favoriser ainsi un métabolisme fermentaire.

Mycéliums de texture lâche provenant de cultures non agitées.

Le changement de métabolisme que subit peu à peu la masse mycélienne de texture lâche, au fur et à mesure qu'augmente la durée d'incubation, s'explique par un appauvrissement en oxygène du milieu nutritif. La quantité d'oxygène initialement dissous dans les 15 cm^3 de milieu nutritif que contient chaque récipient à culture est, à 25° , de $84 \text{ } \mu\text{l}$. Cette quantité est faible et doit être rapidement renouvelée par diffusion. Or, si on admet comme vitesse de diffusion de l'oxygène, $4 \times 10^{-5} \text{ cm}^3/\text{cm}^2/\text{minute}$, (vitesse de diffusion dans l'eau à 25°), et si l'on tient compte que la surface maxima d'échange avec l'atmosphère est 12 cm^2 , surface du milieu liquide, la quantité d'oxygène qui peut être renouvelée par diffusion est, au plus, de $30 \text{ } \mu\text{l}/\text{heure}$ alors que le QO_2 des mycéliums peut être supérieur à 40. Les hyphes mycéliennes sont donc progressivement soumises à l'anaérobiose.

Essais de différents procédés d'aération des cultures mycéliennes.

Nous avons essayé de provoquer pendant la croissance une agitation très modérée qui, tout en permettant d'obtenir des mycéliums de texture lâche, augmenterait la vitesse de diffusion de l'oxygène dans le milieu et dans la masse mycélienne : agitation va et vient lente, agitation rotative de flacons à culture cylindriques. De même, nous avons tenté de réoxygéner le milieu par arrivée d'air au sein du liquide grâce à un bulle à bulle très lent. Dans tous les cas nous n'avons pu éviter la formation d'un mycélium en écheveau, de texture plus dense, même en interrompant par période l'agitation ou l'aération. Et la variation de l'intensité respiratoire en fonction du temps d'incubation reste toujours du même ordre, comme cela apparaît dans le graphique de la fig. 15, soit que l'aération du milieu reste insuffisante, soit que la plus grande cohérence du mycélium ralentisse la diffusion de l'oxygène.

2.5.2. Sensibilité des mycéliums à la concentration en oxygène du milieu d'incubation

Les hyphes mycéliennes sont soumises, au cours de leur croissance,

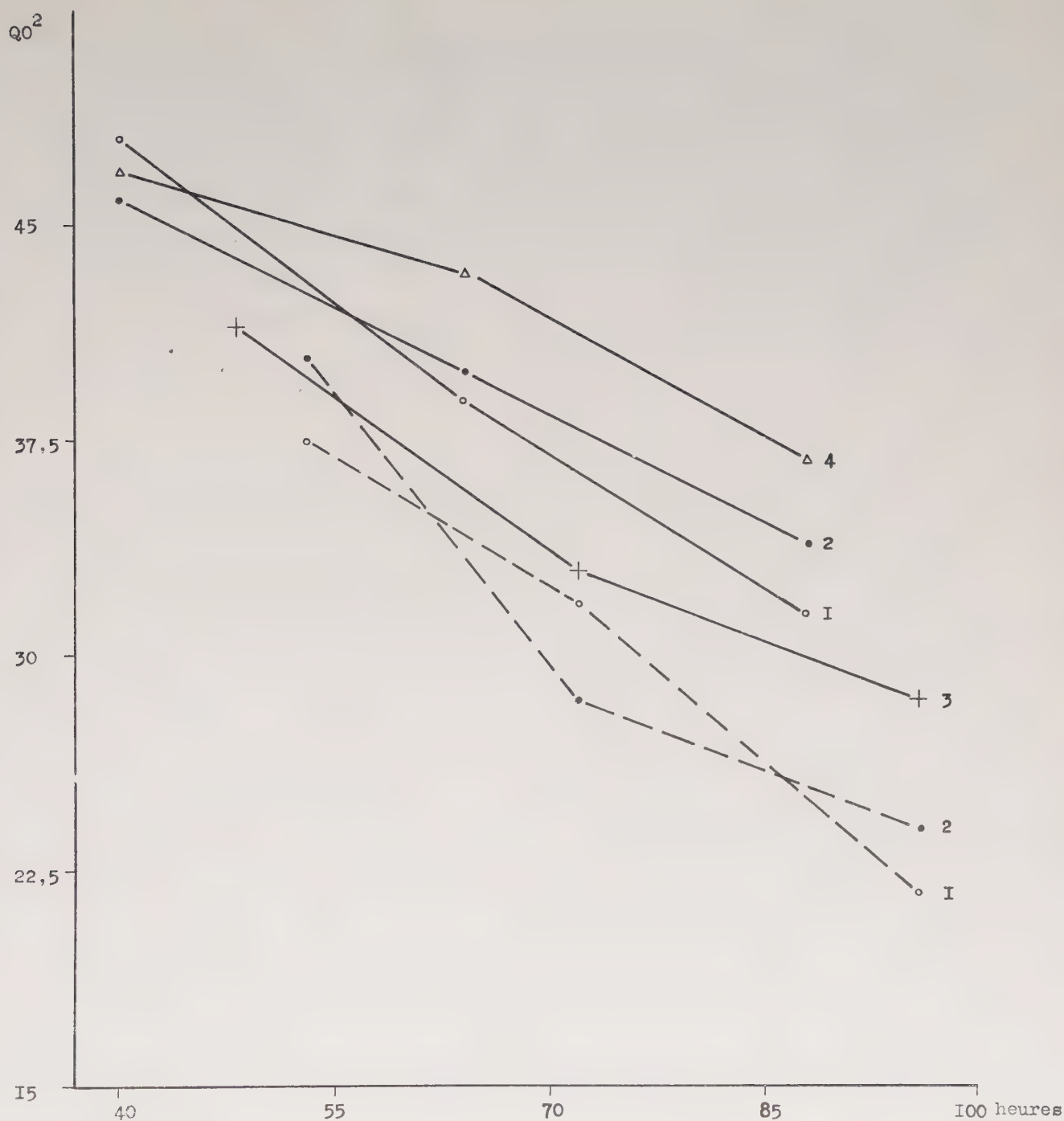


Fig.15 VARIATION DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE
POUR DIFFERENTS PROCEDES D'AERATION

trait continu: *PENIOPHORA CREMEA*
tirets: *PHLEBIA RADIATA*

1 sans agitation, épaisseur couche liquide: 1 cm
2 " " " " " " 2,5 cm
3 bulle à bulle lent
4 agitation rotative lente

à une anaérobiose relative qui augmente en durée et en intensité avec le temps d'incubation des cultures et le développement de la masse mycélienne. La diminution progressive de l'intensité respiratoire, (intensité respiratoire qui, pour les mycéliums non compacts, est toujours mesurée dans des conditions optima d'aération), semble donc résulter d'une sensibilité particulière des mycéliums à la teneur en oxygène du milieu de culture.

Vu son importance, nous revenons sur ce phénomène dans les pages suivantes.

3. MISE EN EVIDENCE D'UN PHENOMENE D'ADAPTATION RESPIRATOIRE

3.1. ACTION INDUCTRICE DE LA CONCENTRATION EN OXYGENE SUR LE METABOLISME ULTERIEUR

3.1.1. Métabolisme aérobie

Action d'une diminution de la concentration en oxygène du milieu de culture.

Nous avons vu, dans le paragraphe 2.3. que les potentialités métaboliques d'un mycélium varient au cours de la croissance en fonction de la durée des cultures : le pouvoir d'oxyder le glucose par respiration décroît, alors que, simultanément, le pouvoir de fermenter ce substrat en présence d'air augmente progressivement. C'est la diminution progressive, pendant la période d'incubation, de la concentration en oxygène du milieu de culture ou au niveau des hyphes qui modifierait ainsi les possibilités métaboliques du mycélium.

Action d'une incubation préalable en milieu plus oxygéné.

Dans le paragraphe 2.4. nous avons montré qu'il se produisait, au cours des mesures manométriques, un phénomène similaire, inverse, relativement rapide mais toujours progressif. Nous l'avons attribué à une augmentation de la concentration en oxygène du milieu, ce dernier étant plus oxygéné dans les fioles du respiromètre, du fait de l'agitation, que dans les flacons à culture.

Il nous a semblé cependant utile de vérifier que l'agitation n'intervient pas par un effet mécanique, mais bien parce qu'elle permet une meilleure oxygénation des hyphes. Pour cela, six mycéliums sont soumis à une incubation de 6 H en atmosphère d'oxygène, dans les fioles de l'appareil de WARBURG, mais sans agitation. Six autres, provenant de la même série de cultures, sont placés dans des conditions similaires, mais pour ceux-ci, l'atmosphère des fioles est constituée par de l'air. Nous procédons ensuite, pendant 1 heure, et en atmosphère ordinaire, à la mesure de la respiration. Les résultats sont reportés dans le tableau XIX.

TABLEAU XIX - Action d'une incubation préalable de 6 heures en atmosphère d'oxygène sur l'intensité respiratoire de Phlebia radiata.

Incubation en atmosphère d'oxygène 6 H. (sans agitation)				Incubation en atmosphère d'air 6 H. (sans agitation)			
Poids sec final mg	$\mu\text{l O}_2$	QO_2	QO_2 moyen	Poids sec final mg	$\mu\text{l O}_2$	QO_2	QO_2 moyen
1,97	75,6	38,3	40,4	2,14	57,1	26,7	25,6
2,22	92,1	41,4		1,39	42,2	30,3	
2,18	85,6	39,2		2,24	58,3	26	
1,62	67,7	41,7		1,89	50	26,5	
2,03	86,8	42,7		1,09	23,2	21,3	
2,19	85,6	39,1		1,77	40,7	23	

Ces résultats montrent que l'incubation préalable en atmosphère d'oxygène augmente de 1,5 à 1,6 fois l'intensité respiratoire.

Si l'accroissement de QO_2 est légèrement plus faible que celui que nous avons constaté au paragraphe 2.4.3, cela tient à ce que l'oxygénation du milieu par l'oxygène pur, mais sans agitation, est évidemment moins efficace que l'oxygénation par l'air avec agitation.

3.1.2. Métabolisme anaérobie

Les observations rapportées jusqu'à présent ne concernant que la respiration et la fermentation aérobie, et l'on peut se demander si la concentration en oxygène du milieu d'incubation influe également sur le métabolisme anaérobie.

Fermentation anaérobie des mycéliums compacts et des mycéliums de texture lâche.

Nous avons vu que la majorité des hyphes d'un mycélium compact de Phlebia radiata est en anaérobiose relative. De ce fait, ces hyphes ont donc subi une incubation à faible concentration d'oxygène. Nous avons comparé la fermentation anaérobie de tels mycéliums à celle de mycéliums de texture lâche n'ayant que 51 heures de culture, et dont le métabolisme aérobie est plus actif. Les résultats d'une mesure manométrique de 4 H sont donnés dans le tableau ci-après, (tableau XX). Nous constatons que l'intensité fermentaire est la même dans les deux cas.

Fermentation anaérobie après incubation préalable en milieu oxygéné et non oxygéné.

Les mycéliums utilisés, de texture lâche, ont 64 H. Les uns sont maintenus 7 H en atmosphère d'azote, dans les fioles manométriques, avant la mesure elle-même dont la durée est de 1 heure. Pendant cette incubation en anaérobiose les fioles sont agitées. Les autres mycéliums sont également introduits dans les fioles de l'appareil, et agités pendant 5 heures en atmosphère ordinaire. Leur QO_2 est ensuite déterminé afin de s'assurer de l'augmentation de l'intensité respiratoire. Puis

TABLEAU XX - Intensité fermentaire anaérobie de Phlebia radiata
après croissance dans des conditions différentes
d'oxygénation.

Mycéliums de texture lâche $QO_2 = 37$			Mycéliums denses $QO_2 = 16$		
Poids sec mg	QCO_2 f anaérobie	QCO_2 f moyen	Poids sec mg	QCO_2 f anaérobie	QCO_2 f moyen
0,70	101	94	0,54	95	95
0,59	86		1,02	96	
0,97	109		0,80	92	
0,47	94		0,84	105	
0,66	82		0,85	81	
0,80	93		1,16	103	

TABLEAU XXI - Intensité fermentaire anaérobie de Phlebia radiata
après une incubation préalable en milieu aéré et
non aéré.

Incubation préalable en atmosphère d'azote - 7 H (avec agitation)			Incubation préalable en atmosphère ordinaire - 5 H (avec agitation)			
Poids sec final mg	QCO_2 f anaérobie	QCO_2 f moyen	Poids sec final mg	QO_2	QCO_2 f anaérobie	QCO_2 f moyen
2	86	95	4,1	51	74	80
2,1	93		3	59	89	
2,8	110		2,9	47	81	
2,5	92		4,6	48	74	

ils sont changés de fioles, placés en atmosphère d'azote, et leur fermentation est mesurée pendant $1 \text{ H } \frac{1}{2}$. Le tableau XXI récapitule les résultats de cette expérimentation.

Nous constatons un léger abaissement du $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ pour les mycéliums dont la respiration a été activée, mais il est trop faible pour être significatif.

3.2. OBSERVATIONS SUR LA CINETIQUE DE L'ADAPTATION RESPIRATOIRE ET SUR LA CONCENTRATION EN OXYGENE REGLANT LE PHENOMENE

Nous avons suivi, par des mesures manométriques, l'augmentation de l'intensité respiratoire en fonction du temps d'incubation en milieu plus oxygéné. Ce dernier est obtenu par l'agitation des fioles soit en présence d'air, soit en présence d'oxygène. L'expérimentation est décrite dans le tableau XXII.

Les résultats ne permettent pas de préciser avec certitude l'allure de la variation, mais ils montrent qu'il s'agit bien d'un phénomène progressif et que le QO_2 atteint son maximum, ou presque, après 5 H d'incubation. Ceci est en accord avec les observations faites à propos de la variation du Q.R. en cours de mesure, (§ 2.4.1). Dans le même temps, le QCO_2^f aérobic diminue progressivement, (fig. 16).

Remarquons d'autre part 1) que le QO_2 maximum n'est pas plus fort après incubation en atmosphère d'oxygène qu'après incubation en atmosphère d'air. La concentration en oxygène nécessaire au phénomène d'adaptation respiratoire n'est donc pas supérieure à $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ par litre.

2) que le QO_2 initial est le même, que la mesure soit effectuée en atmosphère d'air ou en atmosphère d'oxygène : cela signifie qu'à cette concentration en oxygène de $2,5 \times 10^{-4} \text{ M/l}$. le système enzymatique respiratoire est saturé. Il ressort de ces observations que la concentration en oxygène qui prédétermine les potentialités métaboliques du mycélium, et celle qui agit sur le fonctionnement des enzymes respiratoires, sont du même ordre.

Notons au passage que la 2ème remarque prouve à nouveau que la

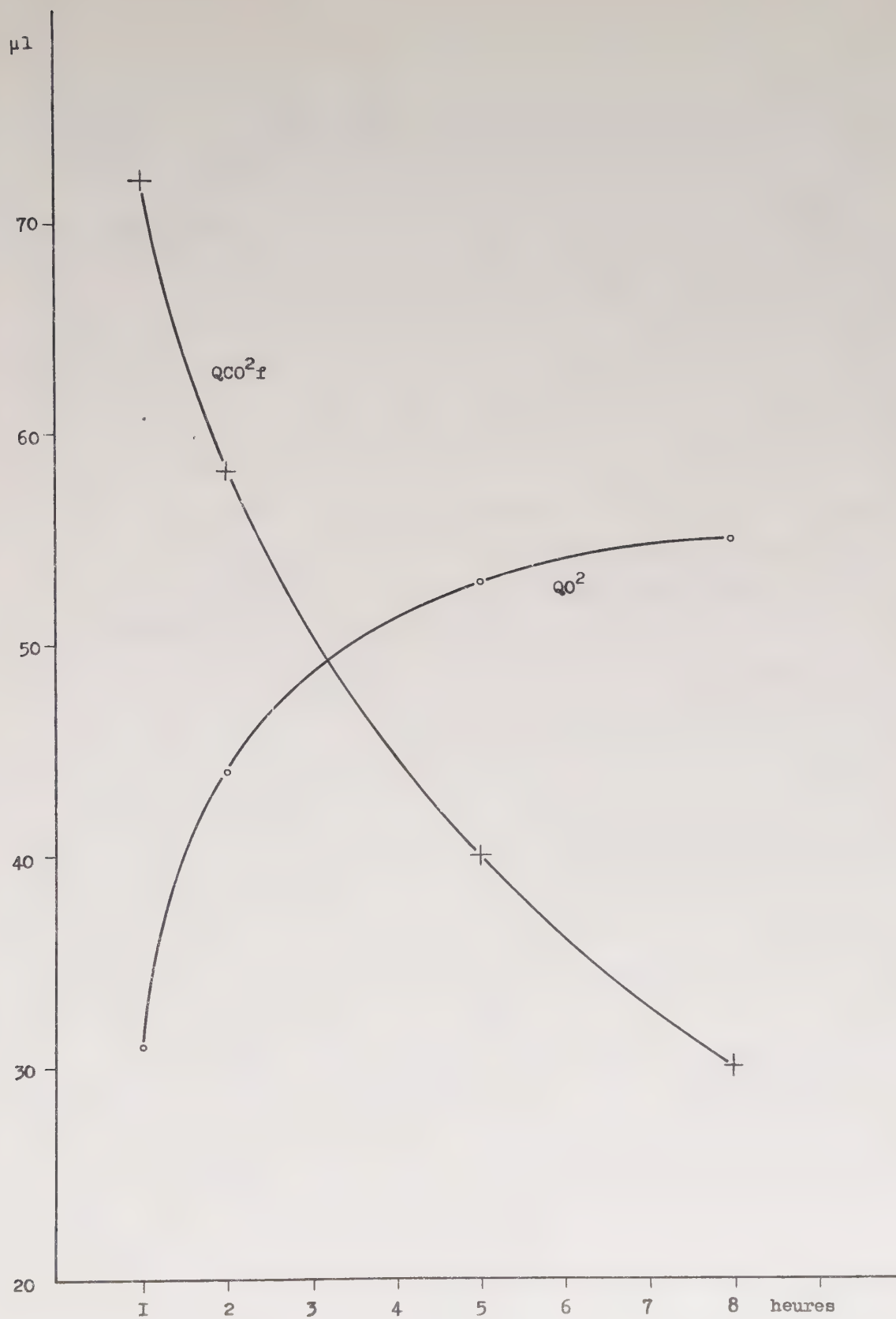


Fig.16 ADAPTATION RESPIRATOIRE CHEZ PHLEBIA RADIATA
 QO_2 ET QCO_2f EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION EN MILIEU AERE

diffusion de l'oxygène n'est pas limitante pour la respiration des mycéliums de texture lâche.

3.3. DISCUSSION

Il résulte, de toutes les observations effectuées sur les échanges gazeux, que la concentration en oxygène du milieu prédétermine, de façon progressive et réversible, le métabolisme ultérieur du mycélium de Phlebia, en conditionnant simultanément, et avec un effet contraire, le métabolisme respiratoire et le métabolisme fermentaire aérobic. Le métabolisme fermentaire anaérobic ne semble pas affecté.

Ce phénomène d'adaptation respiratoire ne paraît pas être particulier aux Phlebia, espèces douées d'aptitude fermentaire, puisque nous avons également mis en évidence, chez Peniophora crenea, une diminution de l'intensité respiratoire en fonction du temps de culture, c'est-à-dire en fonction de l'appauvrissement du milieu en oxygène.

Un tel phénomène a été décrit, pour la première fois, chez la levure et analysé minutieusement par SLONIMSKI (1952) puis observé par d'autres chez des bactéries. Cet auteur est arrivé à la conclusion que la constitution enzymatique de la levure est rigoureusement déterminée par les conditions d'aération ; la synthèse de différents enzymes et des cytochromes, notamment du cytochrome C, est sous la dépendance de la concentration en oxygène. Ces enzymes oxydatifs se formeraient par autocatalyse, selon un processus général d'adaptation enzymatique, l'oxygène jouant le rôle de substrat.

Nous n'avons pas procédé, dans le cadre de ces recherches, à des mesures d'activité enzymatique ou de teneur en cytochrome C. Remarquons toutefois que les observations précédentes sur la concentration à laquelle l'oxygène agit plaide en faveur d'un phénomène d'autocatalyse. D'autre part, la vitesse de l'adaptation respiratoire, qui peut paraître rapide, est du même ordre que chez la levure.

Cette question de la régulation du système respiratoire par l'oxygène est actuellement étudiée chez la levure ou chez les bactéries, par différents auteurs ; citons notamment SLONIMSKI et al. (1963) et PICHINOTY (1963).

TABLEAU XXII - Cinétique de l'activation respiratoire de Phlebia radiata.

Atmosphère d'oxygène				Atmosphère ordinaire			
temps en heures	poids sec mg	QO ₂	QO ₂ moyen	temps en heures	poids sec mg	QO ₂	QO ₂ moyen
1	1,78	28,7	29	1	0,93	33,2	31
	0,86	27,7			2,18	32,7	
	1,40	29,9			1,23	26,8	
3	1,37	39,2	38	2	0,93	44,1	44
	1,67	32,8			0,94	43,1	
	1,03	41,8			1,33	44	
5	1,78	48,3	52	5	2,11	56,6	53
	1,43	50,3			1,16	53	
	1,46	56,9			1,18	50,2	
7	2,72	52,1	49	8	1,01	55,4	55
	1,39	43,8			2,35	51,3	
	1,76	51,8			2,04	57,5	

4. RESUME DU CHAPITRE IV

Nous précisons, en premier lieu, l'action de facteurs expérimentaux habituellement négligés, sur l'intensité respiratoire et, le cas échéant, sur l'intensité fermentaire aérobie, de Phlebia radiata et de Peniophora crenea.

1) L'intensité respiratoire des mycéliums ayant une texture très lâche est supérieure à l'intensité respiratoire des mycéliums de texture plus dense. Les résultats sont l'inverse pour la fermentation aérobie.

2) L'intensité respiratoire diminue avec l'âge de la culture. La chute la plus importante survient en pleine phase de croissance active. La faible et régulière diminution de la teneur en azote organique n'explique pas cette variation. D'autre part, dans le même temps, la fermentation aérobie s'intensifie.

3) Au cours des mesures manométriques, le QO_2 des mycéliums de texture lâche augmente progressivement. En 5 heures, il reprend une valeur égale et parfois même supérieure à celle qui peut être mesurée sur des mycéliums très jeunes, tandis que diminue le QCO_2 f aérobie.

Les changements que subissent l'intensité respiratoire et l'intensité fermentaire aérobie, ont une seule et même cause : l'oxygénation variable du mycélium.

Les variations décrites ci-dessus témoignent d'une sensibilité particulière des mycéliums testés à la concentration en oxygène : la teneur en oxygène du milieu de culture, ou d'un milieu d'incubation préexpérimental, exerce une action inductrice sur le métabolisme aérobie mesuré ultérieurement. En particulier, la respiration peut être activée progressivement. La valeur de la concentration en oxygène permettant l'activation respiratoire est du même ordre que celle qui assure le fonctionnement des enzymes respiratoires. Il s'agit d'un phénomène d'adaptation respiratoire.

CHAPITRE V

METABOLISME ENDOGENE

1. INTRODUCTION

Des cellules de levure, bien que suspendues dans un milieu non nutritif, telle une solution de $\text{PO}_4 \text{KH}_2 \frac{\text{m}}{15}$, sont cependant le siège d'échanges gazeux d'allure respiratoire. Ce phénomène a été nommé respiration endogène ou autorespiration.

Différents auteurs, et notamment STIER et STANNARD (1936), ont montré que ces échanges gazeux correspondent réellement à une respiration qui s'effectue aux dépens d'un substrat interne. L'argumentation de STIER et STANNARD repose principalement sur l'analyse cinétique des échanges gazeux : en exprimant la quantité de substrat respiré pendant un temps Δt , par le volume gazeux y échangé pendant ce temps, et la concentration totale en substrat par le volume gazeux total A échangé pendant toute la durée du phénomène, ces auteurs ont montré que $\frac{dy}{dt} = k' (A-y)$. C'est-à-dire que la cinétique des échanges gazeux est celle d'une réaction d'ordre 1 dont la vitesse ne dépend que d'un seul facteur, la concentration en substrat présumé. L'ensemble des réactions enzymatiques intervenant au cours du phénomène est donc assimilable à la respiration d'un substrat.

Pour des cellules jeunes, n'ayant que 16 H, la variation de $\frac{\Delta \text{O}_2}{\Delta t}$ en fonction du temps se traduit par une hyperbole asymptote à l'axe des abscisses ; $\frac{\Delta \text{O}_2}{\Delta t}$ diminue rapidement pendant les 6 ou 8 premières heures, mais n'approche de l'asymptote qu'après 48 H. Pour des

cellules âgées de 4 jours, STIER et STANNARD ont obtenu une courbe en S , la dégradation des réserves se fait, pendant les deux premières heures, selon une cinétique d'ordre 0, comme pour un système enzymatique saturé.

La consommation des réserves, chez la levure, s'effectue par un processus purement respiratoire : le Q.R. est égal à 1, et, en atmosphère d'azote, la levure intacte ne donne lieu à aucun dégagement de CO_2 .

En ce qui concerne les champignons filamenteux, aucun travail d'ensemble n'a été consacré au métabolisme endogène et les renseignements que l'on possède se rapportent essentiellement aux Penicillium et autres champignons imparfaits. La nature des réserves n'est pas connue, le quotient respiratoire serait celui des lipides. Le QO_2 endogène paraît élevé par rapport au QO_2 mesuré en présence de substrat (COCHRANE, 1958).

Pour les Basidiomycètes, quelques précisions sont données par NEWCOMB et JENNISON (1962) à propos de Polyporus palustris ; ainsi le QO_2 varie de 16 à 5 en 72 H.

Signalons enfin que, à la différence de la levure, un rejet de CO_2 fermentaire, d'origine endogène, a été constaté avec Fusarium lini, par GIBBS (1954).

Nous avons mis en évidence un métabolisme endogène chez Phlebia radiata. Les expérimentations sont effectuées avec des mycéliums de texture lâche, se trouvant dans la phase active de croissance. Les conditions de culture sont celles énoncées dans le premier chapitre.

Toutes les expérimentations sont réalisées, sauf indication, avec un milieu minéral comportant plusieurs sels, de préférence à la solution $\frac{\text{m}}{15}$ de $\text{PO}_4 \text{KH}_2$ couramment utilisée pour la levure. La composition de ce milieu, par litre, est la suivante :

$\text{PO}_4 \text{KH}_2$	5 g
Cl Na	3 g
$\text{Cl}_2 \text{Ca}$	1,5 g
$\text{SO}_4 \text{Mg}$	0,5 g

Sa molarité est de l'ordre de $\frac{\text{m}}{10}$.

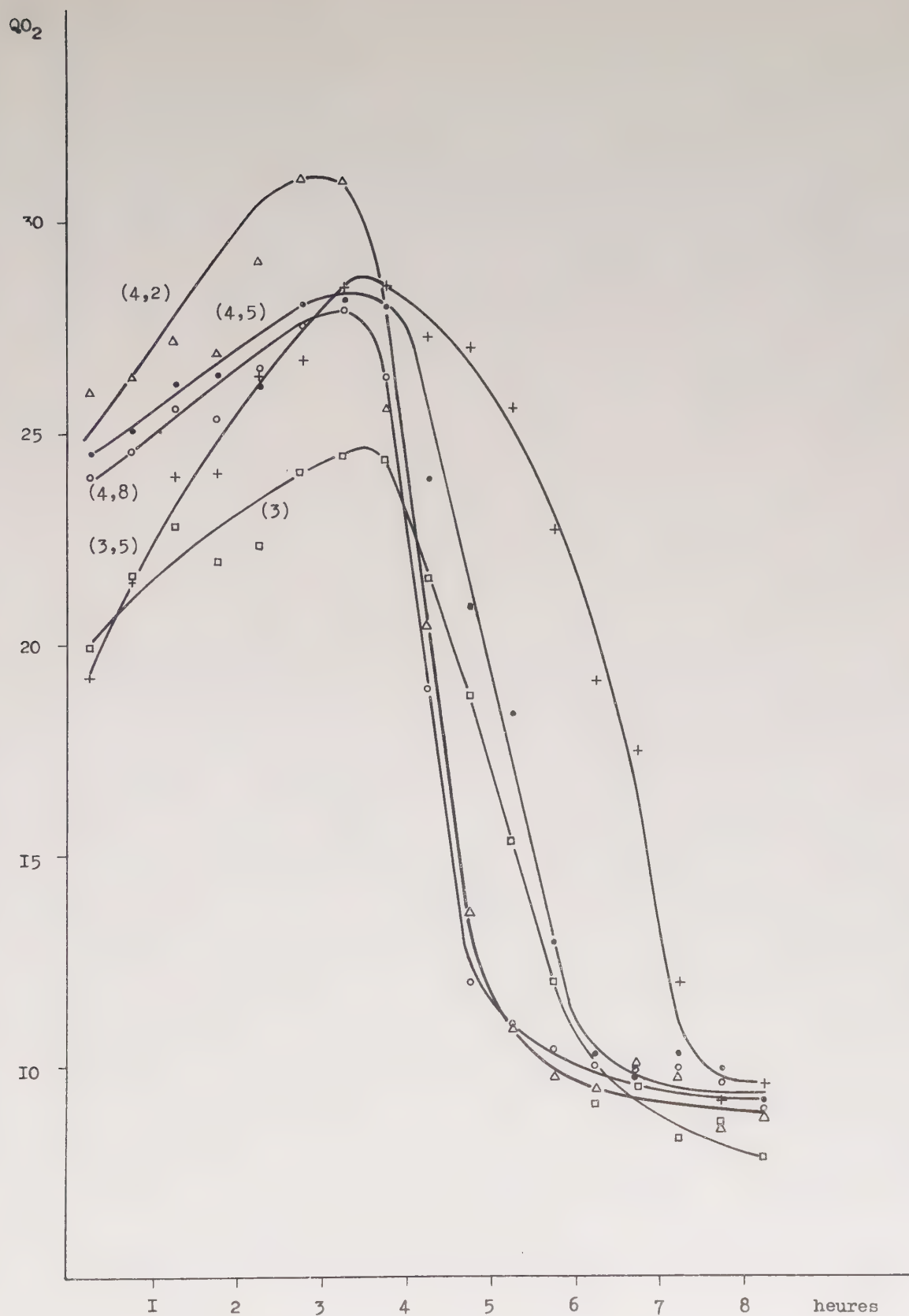


Fig.17 VITESSE DE LA RESPIRATION ENDOGENE DE *PHLEBIA RADIATA*
EN FONCTION DU TEMPS

entre parenthèses: poids sec des mycéliums testés en mg

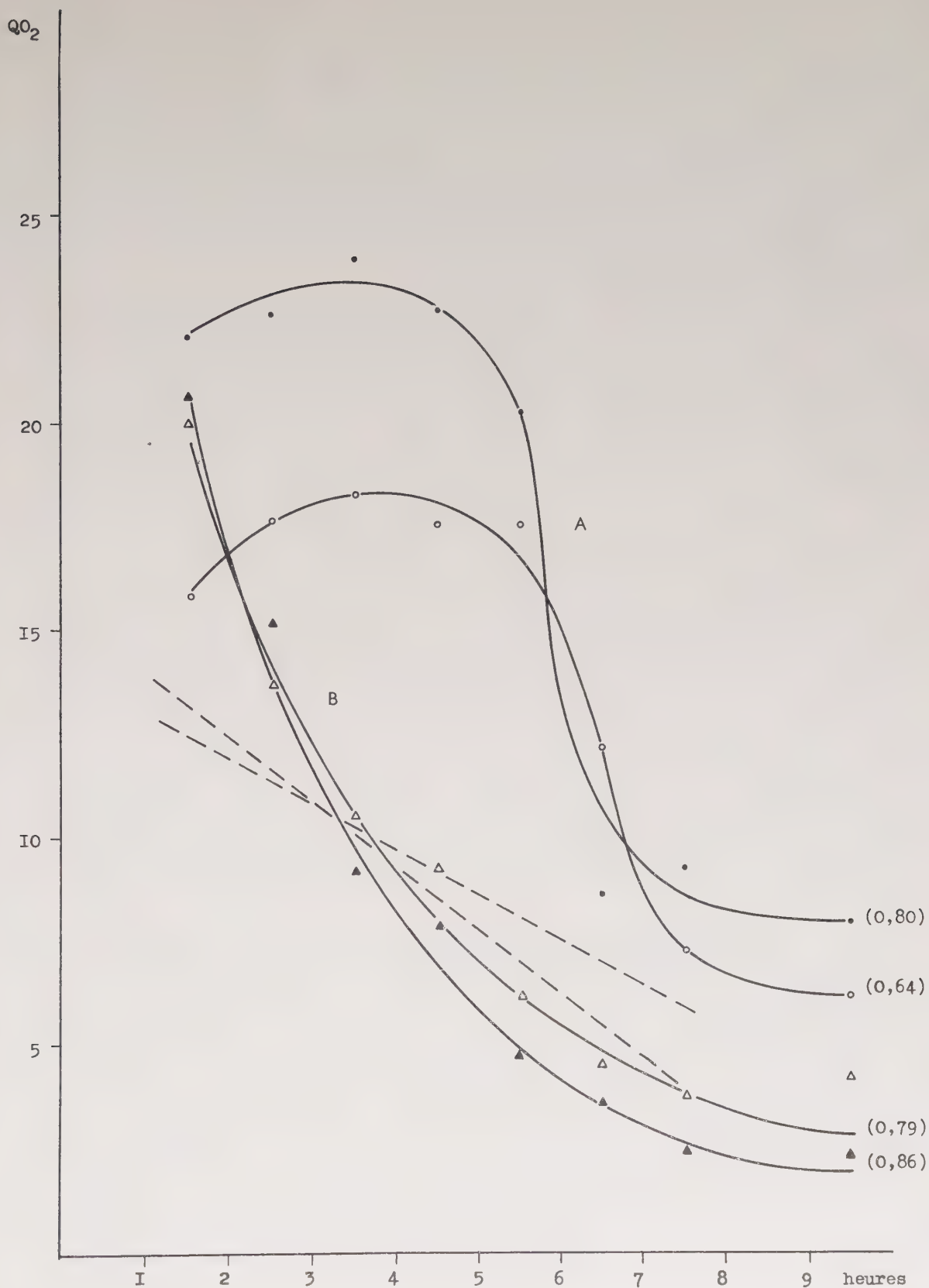


Fig.18 ALLURE DIFFERENTE DE LA CINETIQUE DE LA RESPIRATION ENDOGENE DE PH. RADIATA DANS UNE SOLUTION SALINE EQUILIBREE (A), DANS UNE SOLUTION DE PO_4KH_2 (B)

en trait continu: variation de QO_2 en fonction du temps
 en tirets: variation de $\log QO_2$ (cas des courbes B)
 entre parenthèses: poids sec des mycéliums testés en mg

2. RESPIRATION ENDOGENE

2.1. CINETIQUE ET INTENSITE DU PHENOMENE

Les mycéliums utilisés ont 72 H ; leur poids varie de 3 à 5 mg. Les relevés manométriques de l'absorption de l'oxygène sont effectués toutes les 1/2 heures. Ils débutent environ 30' après le rinçage des mycéliums dans le milieu non nutritif. La variation de l'intensité respiratoire de chacun des mycéliums est représentée figure 17.

Pendant les 3 premières heures, l'intensité respiratoire augmente ; le QO_2 initialement de 20 à 26 passe par un maximum de 25 à 31. Puis, comme pour la levure, il diminue rapidement entre la 3ème et 7ème heure. A la 8ème heure, sa valeur moyenne est voisine de 9. Après 48 H, une absorption d'oxygène est encore mesurable.

Les courbes obtenues sont probablement à rapprocher de la courbe en S observée pour de jeunes cellules de levures. L'augmentation de l'intensité respiratoire au début des mesures résulte très vraisemblablement du phénomène d'adaptation respiratoire déjà mis en évidence.

2.2. ALLURE DE LA CINETIQUE DANS UNE SOLUTION DE $PO_4 \text{ KH}_2 \frac{m}{15}$

Si la solution à constante saline équilibrée est remplacée par une solution de $PO_4 \text{ KH}_2 \frac{m}{15}$, la cinétique de l'absorption de l'oxygène est différente. Nous avons effectué la comparaison sur des mycéliums de 62 H provenant d'une même série de cultures. Nous représentons, figure 18, la variation de QO_2 en fonction du temps pour ces différents mycéliums. La vitesse initiale de dégradation paraît plus grande dans la solution phosphatée. Il n'y aurait pas d'activation respiratoire et, pendant les 5 premières heures, la variation semble être exponentielle.

3. FERMENTATION ENDOGENE

3.1. INTENSITE DU DEGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE EN ATMOSPHERE D'AZOTE

Initialement intense, le rejet de gaz carbonique diminue rapidement et approche de 0 en 5 heures. Il s'agit bien d'un phénomène endogène, car ce rejet subsiste malgré des rinçages longs et multiples.

Nous représentons, figure 19, le dégagement total de gaz carbonique effectué par 2 mycéliums de 62 H pesant 3 et 2 mg. Les relevés manométriques ont lieu d'abord toutes les 10 minutes, puis toutes les 20 minutes. La variation correspondante $\frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t}$ ainsi que celle de $\text{Log } \frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t}$ sont reportés dans la figure 20.

Pendant les 20 premières minutes de mesure, le QCO_2 moyen de chacun des mycéliums est respectivement de 56 et 52,5 ; après une heure de mesure, il est de 31 et 23. Comme la vitesse du rejet gazeux varie exponentiellement, (tout au moins pendant la plus grande partie du phénomène), il est possible de connaître par extrapolation à partir de la droite donnant $\text{Log } \frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t}$, la vitesse initiale du dégagement. Nous avons d'ailleurs réduit $\frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t}$ au minimum, (20'), sans pour cela nuire à l'efficacité des rinçages, la période précédant le début même des mesures manométriques. Le QCO_2 initial, c'est-à-dire au moment où les mycéliums sont séparés du milieu nutritif glucosé, serait de 80. C'est-à-dire qu'il est voisin, sinon égal, au QCO_2 fermentaire mesuré en présence de glucose.

Le volume gazeux dégagé pendant la période préliminaire aux mesures étant ainsi évalué, on peut connaître le volume total de CO_2 rejeté pendant toute la durée du phénomène : il est de l'ordre de 100 μl par mg de poids sec.

3.2. ANALYSE CINETIQUE SELON STIER ET STANNARD

On peut appliquer à ce rejet de CO_2 , le raisonnement tenu par

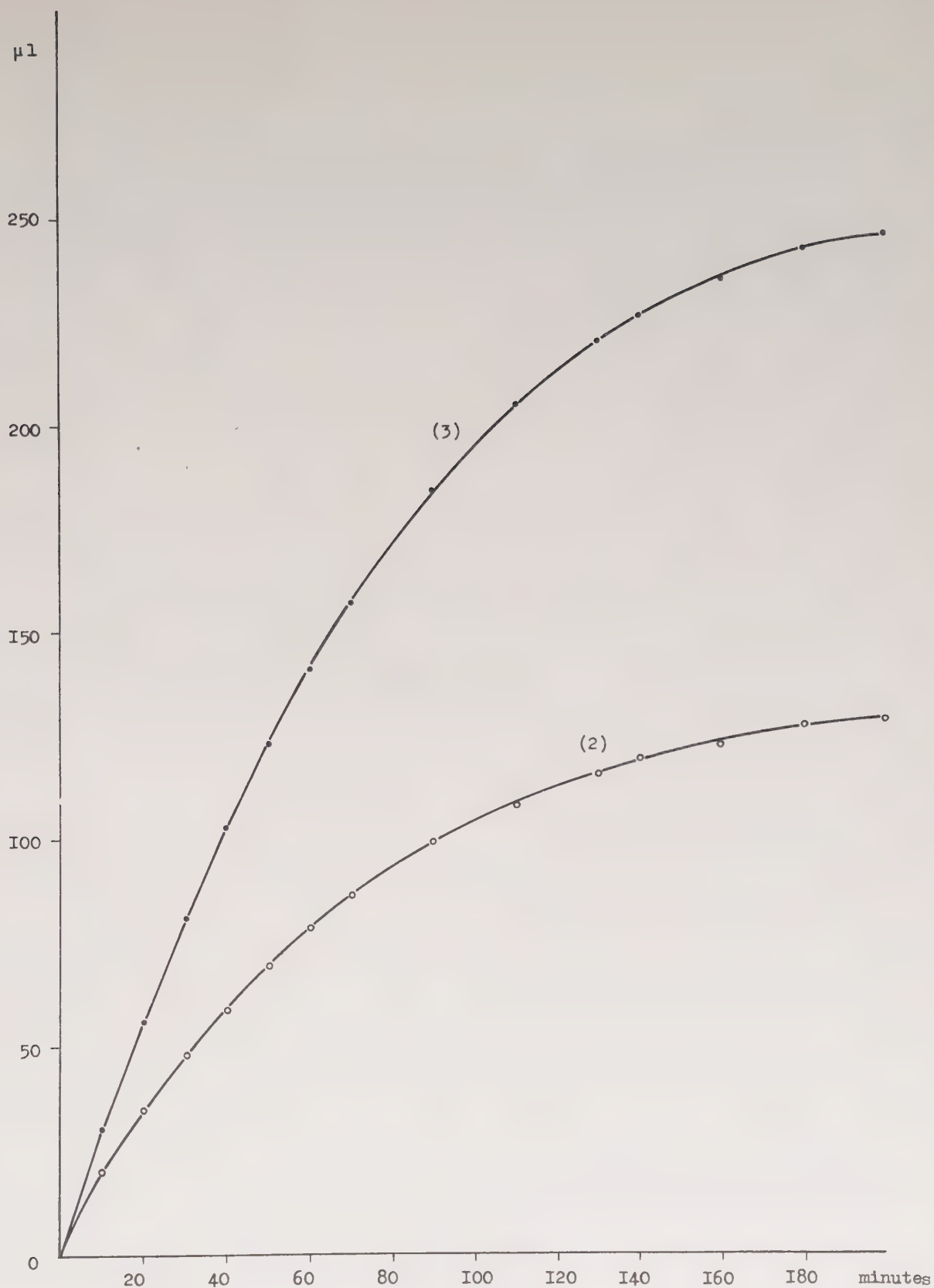


Fig. 19

FERMENTATION ENDOGENE DE PHLEBIA RADIATA
DEGAGEMENT TOTAL DU GAZ CARBONIQUE EN FONCTION DU TEMPS

entre parenthèses: poids sec des mycéliums testés en mg

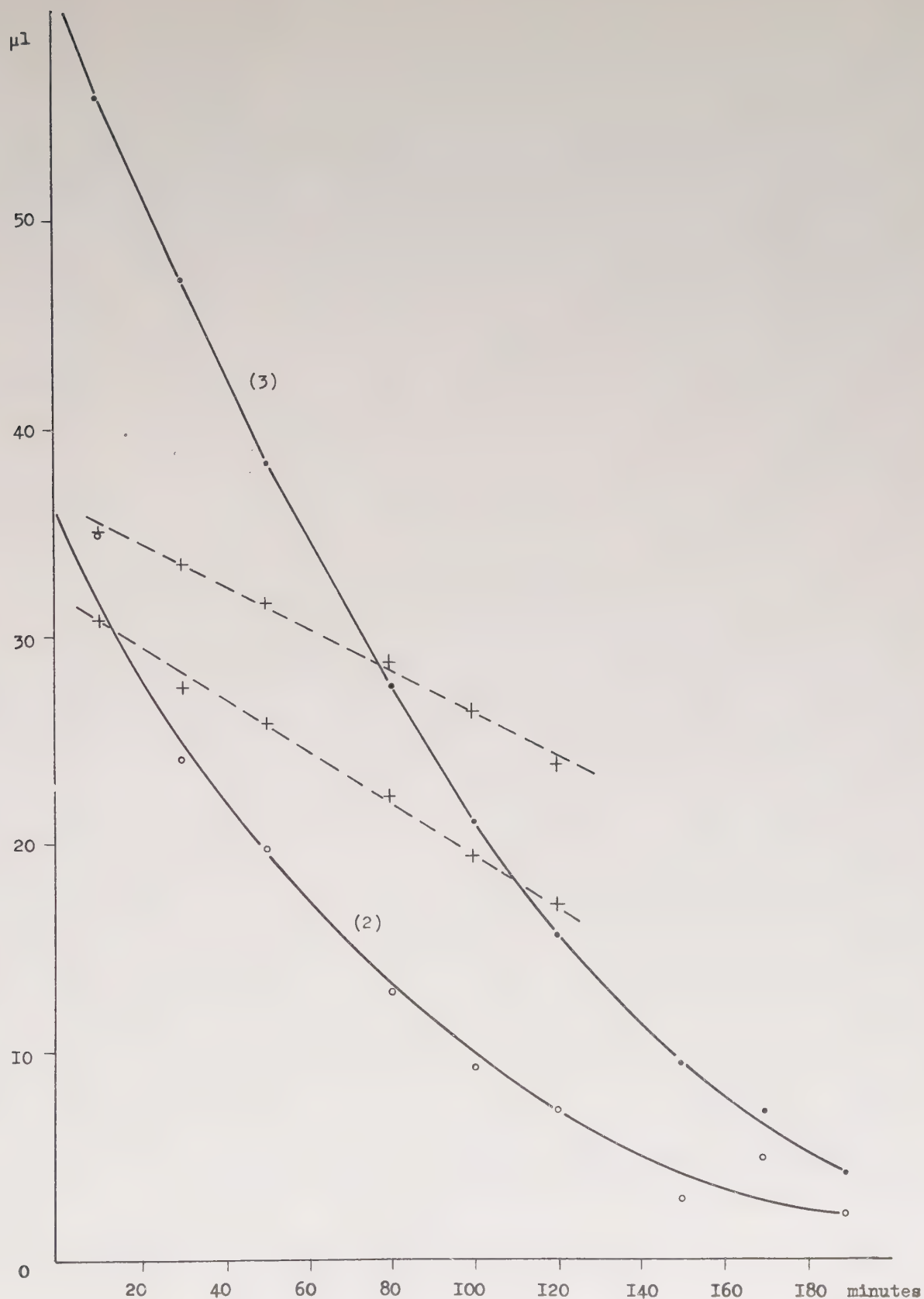


Fig.20 VITESSE DE LA FERMENTATION ENDOGENE DE PH. RADIATA EN FONCTION DU TEMPS

entre parenthèses: p.s. des mycéliums
 en trait continu : $\frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t}$ variation de $\frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t}$, v. dégagé par interv. de t de 20'
 en tirets : $\text{Log } \frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t}$

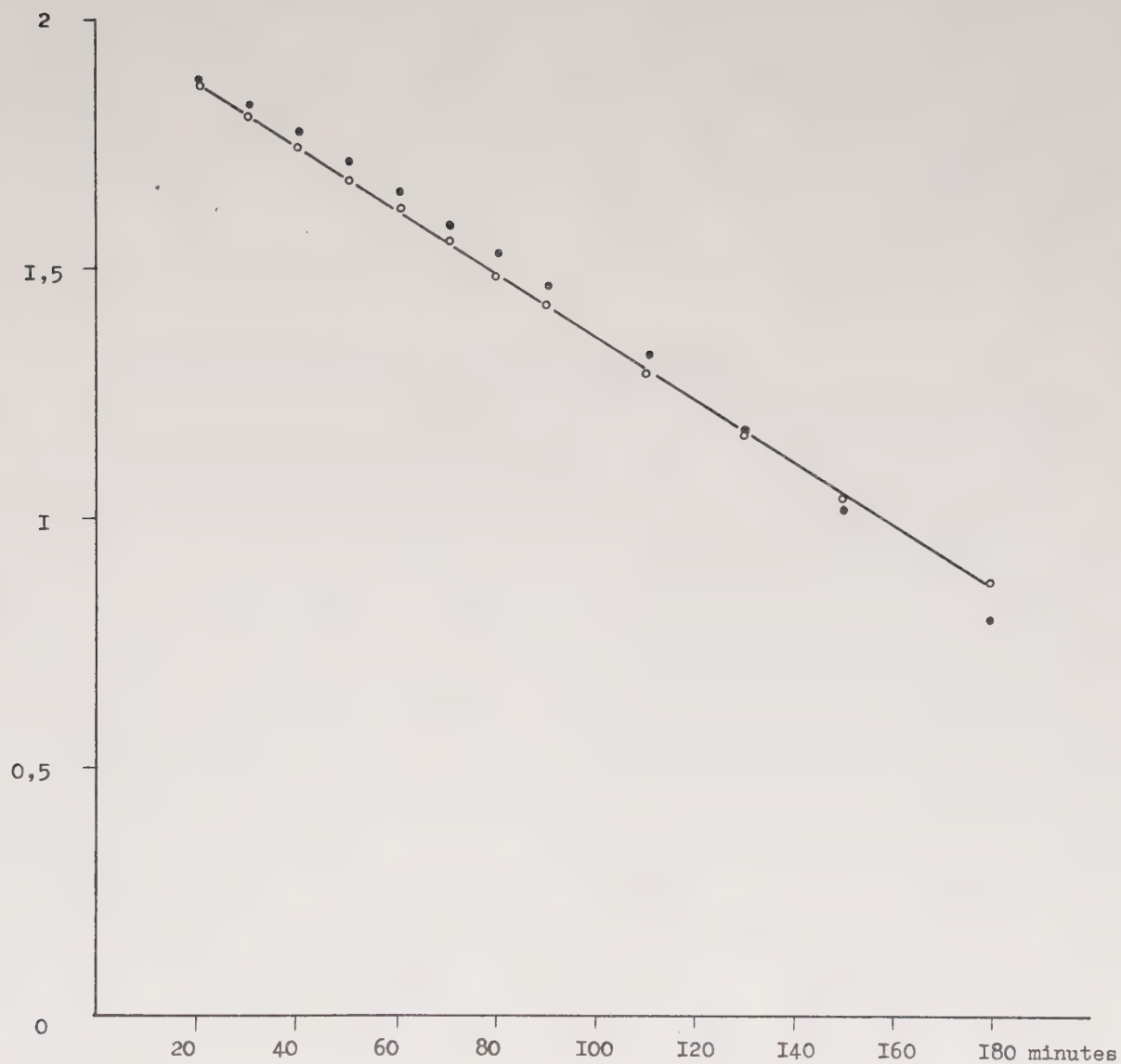


Fig:2I

FERMENTATION ENDOGENE DE PHLEBIA RADIATA

VARIATION DE $\text{Log} \left[\left(1 - \frac{y}{A} \right) \times 10^2 \right]$ EN FONCTION DU TEMPS

trait continu: $A = 180$
non tracé : $A = 330$

STIER et STANNARD pour la respiration endogène de la levure, (voir introduction).

Si la vitesse du dégagement dépend bien, et uniquement, de la concentration d'un substrat interne, on doit pouvoir vérifier dans de larges limites, la relation $\frac{d y}{d t} = k' (A - y)$ c'est-à-dire que $\text{Log} (1 - \frac{y}{A})$ doit être une fonction linéaire du temps. La variation représentée graphiquement figure 21 montre qu'il en est ainsi. Les calculs sont récapitulés dans les tableaux XXIII et XXIV. Nous donnons, comme ces auteurs, $\text{Log} (1 - \frac{y}{A}) \times 10^2$ de préférence à $\text{Log} (1 - \frac{y}{A})$. Nous avons calculé également la constante de vitesse du dégagement gazeux, $k' = \frac{1}{t} 2,3 \text{ Log } \frac{A}{A-y}$.

3.3. CONSTANTE DE VITESSE DU DEGAGEMENT GAZEUX

On pourrait craindre cependant que ce dégagement gazeux, relativement bref, ne soit en fait celui d'un gaz carbonique résiduel accumulé à l'intérieur des hyphes avant la suppression du substrat externe. Il est vraisemblable que, dans ce cas, l'analyse cinétique précédente donnerait les mêmes conclusions. Mais nous avons constaté que la constante de vitesse du rejet de CO_2 , qui est de 0,015, (t étant exprimé en minutes), est du même ordre que celle que l'on peut calculer dans le cas de la fermentation du glucose par des mycéliums préalablement "inanitiés". Le tableau XXV résume ces calculs. Il s'agit du rejet de gaz carbonique provenant de la dégradation anaérobie de 2 μM de glucose ; l'expérimentation effectuée sur 2 mycéliums a été décrite dans le chapitre consacré au métabolisme anaérobie, (§ 3.2). On note, dans le cas de la fermentation du glucose, une légère variation de k' . Elle peut s'expliquer par le maintien, chez les mycéliums utilisés, d'une faible fermentation endogène.

Il est normal que la consommation des réserves hydrocarbonées soit plus rapide, par fermentation que par respiration, le QCO_2 fermentaire initial est, rappelons-le 80, alors que le QO_2 initial n'est que 20 à 25.

TABLEAU XXIII - Analyse cinétique de la fermentation endogène
de *Phlebia radiata* (essai 1)

A = 180		poids sec = 2 mg				
t minutes	ΔCO_2 µl	y	$\frac{y}{A}$	$1 - \frac{y}{A}$	$\left[\left(1 - \frac{y}{A}\right) \times 10^2 \right]^{\text{Log}}$	k'
20	45	45	0,250	0,750	1,875	0,014
30	20	65	0,361	0,639	1,805	0,015
40	15	80	0,444	0,556	1,745	0,015
50	13,5	93,5	0,519	0,481	1,682	0,015
60	10,5	104	0,577	0,423	1,626	0,014
70	10,5	114,5	0,636	0,364	1,561	0,014
80	9,5	124	0,688	0,312	1,494	0,014
90	7,5	131,5	0,730	0,270	1,431	0,014
110	13	144,5	0,802	0,198	1,296	0,015
130	9	153,5	0,852	0,148	1,170	0,015
150	7,2	160,7	0,892	0,108	1,033	0,015
180	6,8	167,5	0,926	0,074	0,869	0,015

TABLEAU XXIV - Analyse cinétique de la fermentation endogène
de Phlebia radiata (essai 2)

A = 330			Poids sec = 3 mg			
t minutes	ΔCO_2 μl^2	y	$\frac{y}{A}$	$1 - \frac{y}{A}$	Log $\left[\left(1 - \frac{y}{A}\right) \times 10^2 \right]$	k'
20	74	74	0,224	0,776	1,890	0,012
30	30,5	104,5	0,316	0,684	1,835	0,013
40	25,5	130	0,393	0,607	1,783	0,013
50	25	155	0,469	0,531	1,725	0,015
60	22	177	0,536	0,464	1,666	0,012
70	20,5	197,5	0,600	0,400	1,600	0,013
80	18,5	216	0,654	0,346	1,539	0,013
90	15	231	0,700	0,300	1,477	0,013
110	28	259	0,784	0,216	1,334	0,015
130	21	280	0,848	0,152	1,181	0,014
150	15	295	0,893	0,107	1,029	0,012
180	15,5	310,5	0,940	0,060	0,778	0,015

TABLEAU XXV - Calcul de la constante de vitesse du dégagement de gaz carbonique dans la fermentation du glucose par Phlebia radiata.

essai 1

A = 89,6 (2 μ M de glucose)				poids sec = 2,4 mg		
t minutes	Δ CO ₂ μ l	y	A - y	$\frac{A}{A - y}$	Log $\frac{A}{A - y}$	k'
12	16,5	16,5	73	1,22	0,086	0,016
27	15,9	32,4	57	1,57	0,195	0,016
42	15,2	47,6	42	2,13	0,328	0,017
57	12,4	60	29,5	3,03	0,481	0,019
72	12,4	72,4	17	5,27	0,721	0,023
87	6,9	79,3	10	8,96	0,952	0,025

essai 2

A = 89,6 (2 μ M de glucose)				poids sec = 3 mg		
t minutes	Δ CO ₂ μ l	y	A - y	$\frac{A}{A - y}$	Log $\frac{A}{A - y}$	k'
12	14,1	14,1	75,5	1,18	0,072	0,013
27	14,1	28,2	61,4	1,45	0,161	0,013
42	13,4	41,6	48	1,86	0,269	0,014
57	12	53,6	36	2,47	0,392	0,015
72	10,6	64,2	25,5	3,51	0,545	0,017
87	6,3	70,5	19,1	4,71	0,673	0,017

4. VARIATION DU RAPPORT DES VOLUMES GAZEUX ECHANGES AU COURS DE LA CONSOMMATION DES RESERVES. EVALUATION DU QUOTIENT RESPIRATOIRE

4.1. REPRESENTATION GRAPHIQUE DES ECARTS DE PRESSION RESULTANT DES ECHANGES GAZEUX

Si l'on représente graphiquement les écarts de pression survenant dans des fioles manométriques dépourvues de KOH, on constate, pour tous les mycéliums, une variation similaire et de grande amplitude. Les courbes de la figure 22 montrent que les valeurs enregistrées, initialement positives, diminuent rapidement, deviennent négatives après 1 H à 1 H 30, passent vers un minimum vers la 3ème heure, puis augmentent et se stabilisent à partir de la 6ème heure. Elles indiquent une variation importante du rapport des volumes gazeux échangés.

4.2. VARIATIONS DANS LE DEGAGEMENT DU GAZ CARBONIQUE

Nous avons calculé, par la méthode directe de WARBURG, les volumes de gaz carbonique rejetés à intervalles de temps réguliers, pour chacun des 4 mycéliums précédents. Nous avons pour cela établi auparavant, avec 4 autres mycéliums provenant de la même série de cultures, une courbe moyenne de la variation du QO_2 endogène.

Nous représentons, fig. 23, les volumes gazeux moyens échangés par unité de poids au cours de la dégradation des réserves, et la variation du rapport $\frac{CO_2}{O_2}$.

On observe sur² la "courbe moyenne" de la figure 23, que le dégagement du gaz carbonique n'est pas régulier. Une variation importante apparaît entre la 3ème et la 6ème heure, variation beaucoup plus marquée dans la courbe propre à chacun des mycéliums (fig.24).

4.3. EVALUATION DU QUOTIENT RESPIRATOIRE

Comme on pouvait s'y attendre, le rapport $\frac{CO_2}{O_2}$ est initialement

bien supérieur à 1. Cela témoigne d'une fermentation aérobie des réserves, simultanée à la respiration. Puis il diminue pour devenir bien inférieur à 1, ensuite il réaugmente et se stabilise au voisinage de 1.

Du fait du métabolisme fermentaire, il est impossible de connaître le Q.R. vrai, c'est-à-dire le rapport $\frac{CO_2}{O_2}$ des échanges purement respiratoires. On constate cependant que de la 2ème à la 6ème heure d'expérimentation, ce Q.R. est bien inférieur à 1, puisque le rapport $\frac{CO_2 \text{ total}}{O_2}$ est lui-même inférieur à 1.

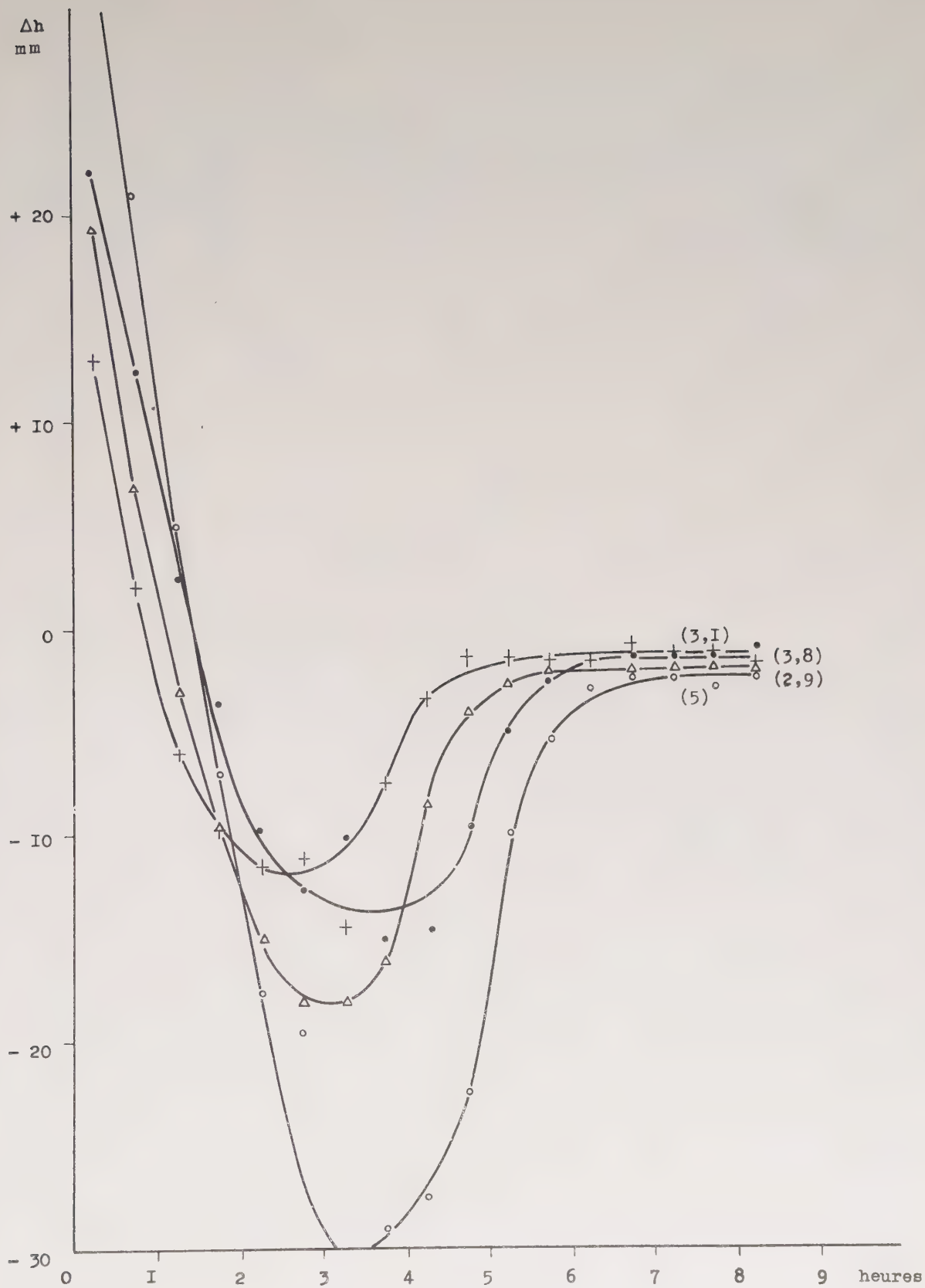


Fig.22

METABOLISME ENDOGENE DE PHLEBIA RADIATA
VARIATION DE Δh EN FONCTION DU TEMPS DANS DES FIOLES SANS KOH

entreparenthèses: poids sec des mycéliums en mg

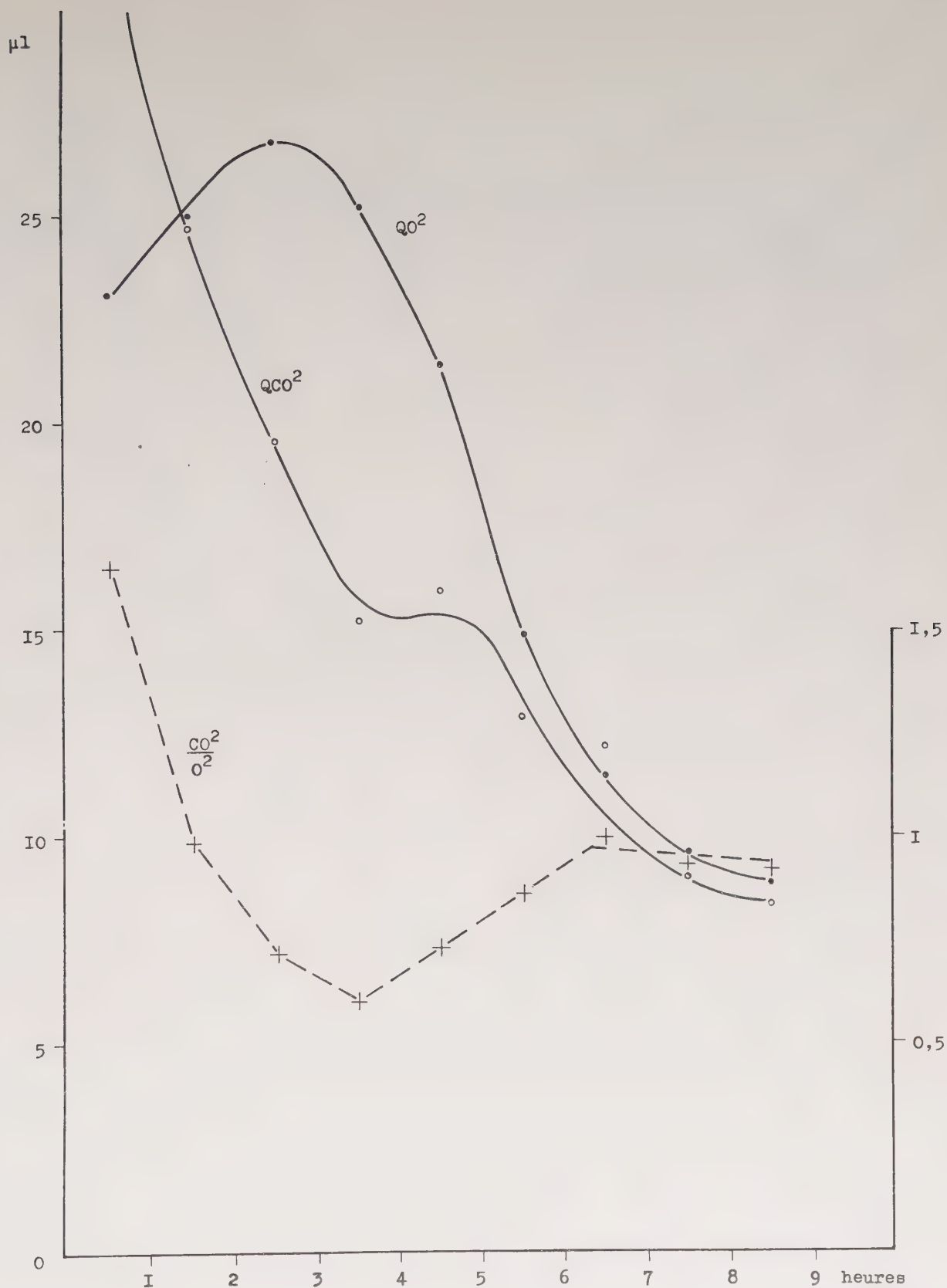


Fig.23 VARIATION DU RAPPORT DES VOLUMES GAZEUX ECHANGES PENDANT LA DEGRADATION DES RESERVES DE PHLEBIA RADIATA

trait continu: variation de l'intensité des échanges gazeux
(courbes moyennes)
tirets: rapport $\frac{\text{QCO}_2}{\text{QO}_2}$

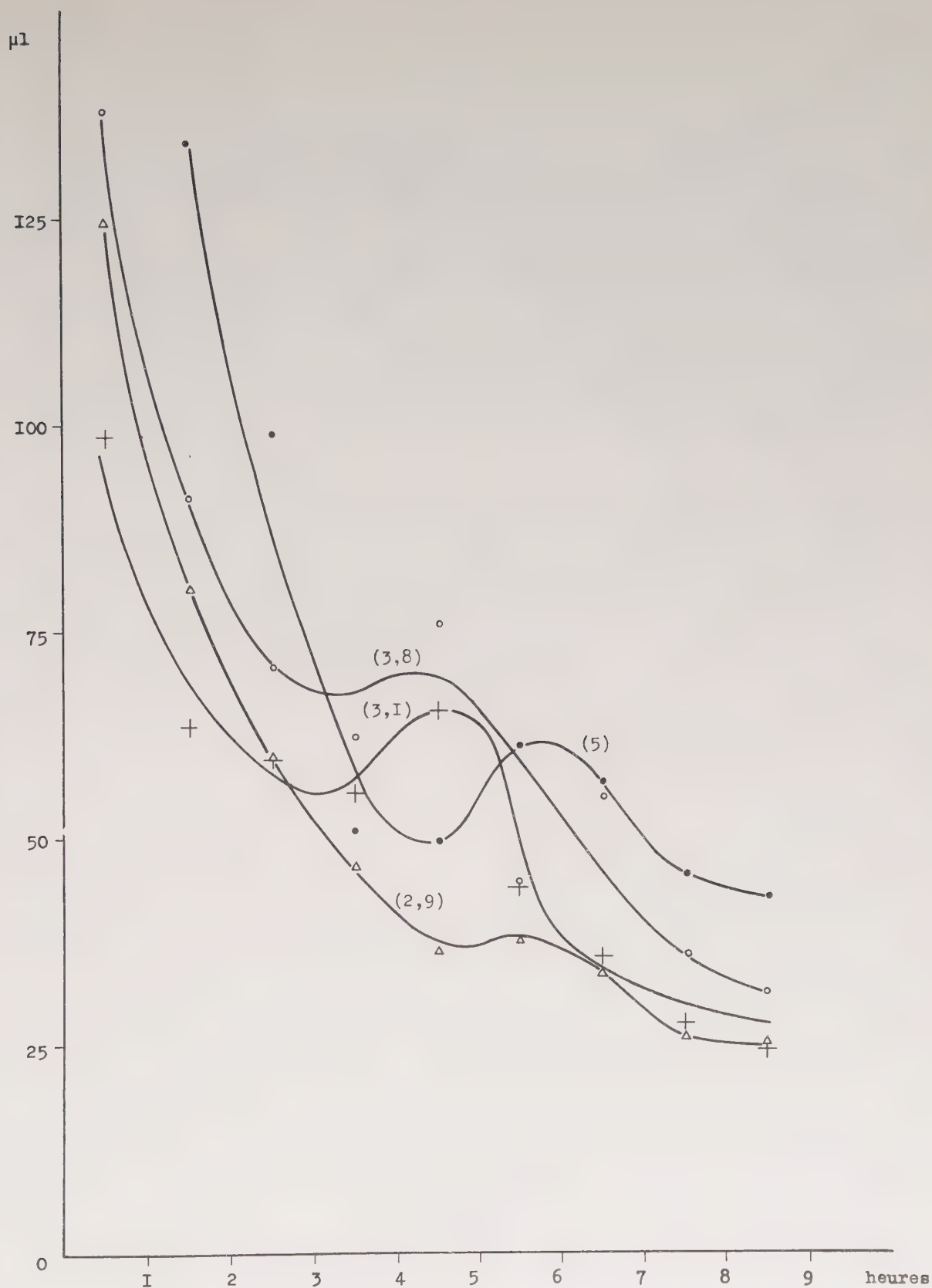


Fig.24 VARIATION DE LA VITESSE DU DEGAGEMENT DE CO₂ PENDANT LA DEGRADATION DES RESERVES DE PHLEBIA RADIATA EN ATMOSPHERE ORDINAIRE

en ordonné: volumes dégagés par 1/2 H
entre parenthèses: p.s. des mycéliums en mg

5. RESUME DU CHAPITRE V

Nous mettons en évidence chez Phlebia radiata une respiration et une fermentation endogène.

La cinétique de la respiration est différente quand le milieu de suspension comprend plusieurs sels ou seulement du phosphate monopotassique. Le QO_2 initial est très voisin, sinon égal au QO_2 mesuré en présence de glucose.

Pour la fermentation endogène, nous procédons à une analyse de la cinétique du rejet gazeux analogue à celle effectuée par STIER et STANNARD pour la respiration endogène de la levure. L'intensité fermentaire initiale est aussi élevée, ou presque, qu'en présence de glucose. La constante de vitesse du dégagement gazeux est de l'ordre de 0,015.

On peut présumer que pendant la dégradation aérobie des réserves, le Q.R. est inférieur à 1.

C O N C L U S I O N S

La Physiologie du mycélium des Basidiomycètes, et d'une façon générale, des champignons supérieurs, n'a jusqu'à présent donné lieu qu'à de rares travaux, et nos connaissances sont insuffisantes, voire même inexistantes, sur des points pourtant essentiels : cinétique et taux de la croissance, aptitude fermentaire et type de fermentation, intensité du métabolisme aérobie, importance du métabolisme endogène. Nous avons traité ces différentes questions d'ailleurs plus ou moins interdépendantes. Nous avons de plus abordé un problème de morphogénèse lié à la croissance de diverses espèces en milieu liquide.

Certaines de nos conclusions débordent du cadre des Basidiomycètes et sont en fait valables pour l'ensemble des champignons filamenteux.

°
° °

Il est très exceptionnel de trouver dans la littérature une étude cinétique de la croissance d'un mycélium. On sait pourtant tout l'intérêt que peut présenter l'analyse d'une courbe de croissance. On admettait, à la suite des observations faites notamment sur l'Ascomycète Neurospora crassa, que chez les champignons filamenteux la croissance est de type linéaire ; nous avons montré que chez Phlebia radiata elle s'effectue, dans une première phase, de façon exponentielle. C'est l'insuffisance de l'aération, à laquelle il est difficile de remédier car elle est la conséquence de la texture même du mycélium, qui modifie ensuite la cinétique de la croissance en même temps qu'elle provoque, pour cette espèce, un changement dans le métabolisme. Ce problème de l'aération efficace du mycélium a faussé, à notre avis, l'interprétation des expérimentations antérieures.

L'existence de cette phase exponentielle assure que la croissance n'est limitée, à son début, par aucun facteur. Le calcul d'un taux

spécifique de croissance est alors possible.

°
° °

On sait que des Basidiomycètes très variés, Agaricales ou Aphyllophorales, sont capables de pousser dans la profondeur d'un milieu nutritif liquide, donc à une faible concentration d'oxygène. Nous avons montré que ceux qui peuvent croître en anaérobiose sont en nombre très limité. L'aptitude fermentaire est donc peu répandue chez ces champignons. Cependant, nous avons trouvé que certains Corticiés, Phlebia radiata, Merulius rufus, Corticium ochraceo-fulvum, ont un métabolisme anaérobie actif. Il s'agit d'une fermentation alcoolique. Le $Q_{CO_2}^{N_2}$ est de l'ordre de 100. La quantité d'éthanol et de CO_2 apparue par mole de glucose fermenté correspond à l'équation de GAY-LUSSAC ; nous avons seulement noté, par rapport à la fermentation de la levure, des différences dans les produits mineurs.

Du point de vue taxinomique, il est assez remarquable de constater que, sur les 24 Corticiés testés, les 3 espèces présentant une nette aptitude fermentaire sont maintenant réunies par les systématiciens modernes dans le même genre Phlebia. Elles étaient autrefois classées dans des genres différents sous le seul prétexte que l'hyménium présente une surface lisse dans une espèce, des plis rayonnants dans une autre, des plis anastomosés dans la troisième. Cela prouve, s'il en était besoin, que des similitudes physiologiques peuvent souligner ou révéler une affinité systématique.

°
° °

La persistance éventuelle du métabolisme fermentaire en atmosphère normale, c'est-à-dire la fermentation aérobie, n'avait jamais été mise en évidence chez les champignons supérieurs. Quant à l'intensité respiratoire, elle n'a été que très rarement mesurée, et la diminution qu'elle subit au cours de la croissance, diminution notée également

chez d'autres champignons filamenteux, était restée sans explication, ou considérée comme résultant d'un vieillissement du mycélium.

Nous avons constaté que pour une même espèce, l'intensité de la respiration et l'intensité de la fermentation aérobique sont sujettes à de grandes variations, bien qu'elles soient évaluées dans des conditions standard. Ainsi le QO_2 de Peniophora crenea peut varier de 60 à 15, celui de Phlebia radiata de 60 à 10, celui de Corticium ochraceo-fulvum, de 80 à 10. Ces deux derniers dégradent partiellement le glucose par fermentation en aérobiose, leur QCO_2 f aérobie peut être compris entre 80 et 10.

Nous avons montré que trois facteurs expérimentaux sont à l'origine de cette variabilité : la texture plus ou moins compacte du mycélium, la durée de la culture et la durée de la mesure manométrique elle-même. Leur action résulte en fait de celle d'une seule et même variable, l'oxygénation du mycélium. En particulier, la diminution de l'intensité respiratoire que nous avons reconnue au cours de la croissance de Phlebia radiata et de Peniophora crenea, et très vraisemblablement celle qui a été notée par certains auteurs pour des espèces aussi diverses que Botrytis cinerea, Polyporus palustris et Myrothecium verrucaria, ne provient pas d'un vieillissement du mycélium, mais de l'allongement du temps de culture dans des conditions d'aération insuffisante.

Un phénomène d'adaptation respiratoire, particulièrement intense chez Phlebia radiata, explique l'importance de l'oxygénation du mycélium pendant la culture. La concentration en oxygène dont disposent les hyphes, soit pendant toute la culture, soit pendant une période préexpérimentale, n'intervient pas seulement sur le fonctionnement des enzymes mais aussi sur les potentialités métaboliques. Tout se passe comme si l'oxygène était indispensable à la synthèse des enzymes respiratoires. En particulier, après culture dans des conditions d'aération insuffisante, il se produit pour cette espèce, en présence d'oxygène, une activation progressive de la respiration et, simultanément, une diminution progressive de la fermentation aérobique. Ce phénomène est apparemment très semblable à celui décrit par SLONIMSKI pour la levure, puis observé par d'autres chez certaines bactéries.

Notre travail fait ainsi apparaître l'importance du problème de l'aération pour les cultures mycéliennes. D'une part, les conditions d'oxygénation interviennent comme un régulateur des potentialités enzymatiques, d'autre part, il est difficile d'obtenir pendant sa culture, une aération constante du mycélium dans toutes ses parties. Notamment, pour des espèces à croissance rapide, l'agitation ou l'insufflation d'air ne permettent pas, comme pour les levures ou les bactéries, une meilleure aération ; au contraire, elles la diminuent en provoquant la formation d'un mycélium de texture plus compacte. Il semble que jusqu'à présent l'on ait prêté que trop peu d'attention à cette conséquence de la structure filamenteuse.

°
° °

En ce qui concerne le métabolisme endogène, jusqu'à présent peu étudié chez les champignons filamenteux, notre travail a montré que, contrairement à la levure, Phlebia radiata peut aussi bien utiliser ses réserves par fermentation que par respiration.

De plus, l'intensité respiratoire initiale, c'est-à-dire celle qui pourrait être observée au début de la consommation des réserves, de même que l'intensité fermentaire initiale, sont très voisines, sinon égales, à l'intensité respiratoire et à l'intensité fermentaire mesurées en présence de glucose.

Enfin, l'utilisation d'un milieu de suspension ne comprenant que du PO_4KH_2 modifie la cinétique de la respiration endogène.

°
° °

Lorsque le mycélium secondaire normalement bouclé et binucléé de certains Basidiomycètes se développe dans la profondeur d'un milieu nutritif, solide ou liquide, il reprend l'aspect du mycélium primaire : les boucles ne se forment plus et les articles deviennent cénocytiques.

Il a été montré que ces modifications apparaissent ou disparaissent de façon réversible selon les conditions de culture. La morphogénèse du mycélium est donc sous la dépendance d'un facteur externe. Le phénomène peut être observé tant chez les Agaricales que chez les Aphyllophorales.

Il était tentant de voir dans l'absence ou la présence de l'oxygène la cause de ces modifications. Nous avons montré qu'il n'en était rien, tout au moins en ce qui concerne les boucles. C'est le gaz carbonique, à forte concentration, qui inhibe leur formation.

Pour les espèces étudiées, la forte accumulation du gaz carbonique dans le milieu de culture est due à un métabolisme fermentaire.

La concentration du CO_2 influe non seulement sur la production des boucles, mais aussi sur le calibre des hyphes et leur ramification. Nous avons donc là un exemple du rôle qu'un facteur chimique externe peut jouer sur la morphogénèse.

B I B L I O G R A P H I E

- BAVENDAMM, W. 1928. Neue Untersuchungen über die Lebensbedingungen holzerstörender Pilze. - Centr. Bakteriол. Parasitenk. (Abt. II) 75 : 426-452.
- BOIDIN, J. 1954. Essai Biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés. Etude spéciale du comportement nucléaire et des mycéliums. - Thèse Lyon. - Mém. Hors-sér. 6, Rev. Mycologie Paris, 1958.
- BOIDIN, J. 1964. Valeur des caractères cultureux et cytologiques pour la taxinomie des Thelephoraceae résupinés et étalés - réfléchis (Basidiomycètes). - Bull. Soc. Bot. France, 111 : 309-315.
- BOURDOT, H. et GALZIN, A. 1928. Hyménomycètes de France. Lechevalier, Paris.
- BROCKMANN, M.C. and STIER, T.J.B. 1947. Steady state fermentation by Yeast in a growth medium. - J. Cell. Comp. Physiol. 29 : 1-14.
- CANTINO, E.C. 1949. The physiology of the aquatic Phycomycete Blastocladi pringsheimii, with emphasis on its nutrition and metabolism. - Am. J. Botany 36 : 95-112.
- CANTINO, E.C. 1956. The relation between cellular metabolism and morphogenesis in Blastocladiella. - Mycologia 48 : 225-240.
- CARLES, J., SCHWINDER, A. et LACOSTE, A-M. 1958. Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques. - Bull. Soc. Chim. Biol. 40 : 221-232.
- CHEFTTEL, R., MUNIER, R. et MACHEBOEUF, M. 1951. Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils. - Bull. Soc. Chim. Biol. 33 : 840-861.
- CHEFTTEL, R. MUNIER, R. et MACHEBOEUF, M. 1952. Microchromatographie sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils. - Bull. Soc. Chim. Biol. 34 : 380-387.
- COCHRANE, V. 1958. Physiology of Fungi. John Wiley and Sons, New York.
- CONWAY, E.J. et BRADY, T.G. 1950. Biological production of acid and alkali. I Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. - Biochem. J. 47 : 360-369.

- DARBY, R. and GODDARD, D. 1950. Studies of the respiration of the mycelium of the fungus Myrothecium verrucaria. - Am. J. Bot. 37 : 379-387.
- DIXON, M. 1951. Manometric Methods. III Ind Ed. The University Press, Cambridge.
- EMERSON, S. 1950. The growth phase in Neurospora corresponding to the logarithmic phase in unicellular organisms. - J. Bacteriol. 60 : 221-223.
- FRIEDMANN, Th. 1938. The identification and quantitative determination of volatile alcohols and acids. - J. Biol. Chem. 123 : 161-184.
- GENTILE, A. 1954. Carbohydrate metabolism and oxalic acid synthesis by Botrytis cinerea. - Plant. Physiol. 29 : 257-261.
- GIBBS, M., COCHRANE, V., PAEGE, L.M. and WOLIN, H. 1954. Fermentation of D-Xylose-I-C14 by Fusarium lini BOLLEY. - Arch. Biochem. Biophys. 50 : 237-242.
- GOKSØYR, J. 1958. Studies on the metabolism of Merulius lacrymans (Jacq.) Fr. Carbohydrate Consumption, Respiration and Acid Production in Surface Cultures. - Physiol. Plantar. 11 : 855-865.
- GUILLAUME, J., BEERENS, H. et OSTÉUX, R. 1956. La chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils de C1 à C6. Son application à la détermination des bactéries anaérobies. - Ann. Inst. Pasteur Lille 8 : 13-23.
- GUNDERSEN, K. 1961. Growth of Fomes annosus under Reduced Oxygen Pressure and the Effect of Carbon Dioxide. - Nature 13 : 649.
- HUMFELD, H. 1948. The production of mushroom mycelium (Agaricus campestris) in submerged culture. - Science 107 : 373.
- JENNISON, M. 1948. The growth of Wood-Rotting fungi in submerged culture. - Amer. J. Bot. 35 : 801.
- JENNISON, M., NEWCOMB, M.D. and HENDERSON, R. 1955. Physiology of the Wood-Rotting Basidiomycetes. I. Growth and nutrition in submerged culture in synthetic media. - Mycologia 47 : 275-304.
- KARIYONE, T., HASHIMOTO, Y. and KIMURA, M. 1951. Paper-partition chromatography of alcohols with the potassium xanthogenates. - Nature 168 : 511.
- KNIEP, H. 1918. Über die Bedingungen der Schnallenbildung bei den Basidiomyceten. - Flora (N.F.) 11 : 380-395.

- KOEHLER, L.H. 1952. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. - *Anal. Chem.* 24 : 1576-1579.
- KÜHNER, R. 1950. Absence de boucles et comportement nucléaire dans le mycélium de divers Homobasidiés. - *C.R. Acad. Sc.* 230 : 1888-1890.
- KÜHNER, R. et YEN, H.C. 1947. Les bizarreries mycéliennes de Merulius rufus Pers. - *Bull. Soc. Mycol. France* 63 : 159-168.
- LAFON, M. 1955. Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la Fermentation alcoolique. - Thèse Bordeaux.
- LOISELEUR, J. 1954. Techniques de Laboratoire. Masson et C° Paris, 2e Ed.
- MEYERHOF, O., KIESSLING, W. et SCHULZ, W. 1937. The equations of the reaction of alcoholic fermentation. - *Biochem. Z.* 292 : 25-67.
- MONOD, J. 1958. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Herman, Paris.
- MYERS, J. 1953. Growth characteristics of algae in relation to the problems of mass culture. In : *Algal Culture*, Carnegie Institution Publ. Washington.
- NEWCOMB, H. and JENNISON, M. 1962. Physiology of Wood-Rotting Basidiomycetes. IV. Respiration of non-proliferating cells of Polyporus palustris. *Canadian J. Bot.* 8 : 145-156.
- NICLOUX, M. 1931. Recherches sur l'alcool éthylique I. Microdosage. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 13 : 857-879.
- NORD, F.F. and SCIARINI, L. 1946. On the Mechanism of Enzyme Action. Part. 27. The Action of Certain Wood-Destroying Fungi on Glucose, Xylose, Raffinose and Cellulose. - *Arch. Biochem.* 2 : 419-437.
- ODDOUX, L. 1955. Recherches sur les Mycéliums Secondaires des Homobasidiés en culture pure. Morphologie-Cytologie-Exigences alimentaires. - Thèse Lyon.
- PERLMAN, D. 1949. Studies on the Growth and Metabolism of Polyporus anceps in submerged culture. - *Am. J. Bot.* 36 : 180-184.
- PERLMAN, D. 1950. Observations on the production of ethanol by Fungi and Yeasts. - *Am. J. Bot.* 37 : 237-241.

- PICHINOTY, F. 1963. L'effet oxygène et la biosynthèse des enzymes d'oxydo-réduction bactériens. - Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les Microorganismes. Coll. inter. C.N.R.S. 124, Ed. C.N.R.S. Paris.
- RIBEREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E. et LAFON, M. 1955. Recherches sur la genèse des produits secondaires de la Fermentation alcoolique. - Bull. Soc. Chim. Biol. 37 : 457-473.
- SCHEFFER, T.C. and LIVINGSTON, B.E. 1937. Relation of oxygen and temperature to Growth and Carbon-Dioxide production in the fungus Polystictus versicolor. - Am. J. Bot. 24 (N° 3) : 109-119.
- SLONIMSKI, P. 1952. Recherches sur la Formation des Enzymes respiratoires chez la Levure. - Thèse Paris. Ed. Desoer, Liège, 1953.
- SLONIMSKI, P., ACHER, R., PERE, G., SELS, A. et SOMLO, M. 1963. Eléments du système respiratoire et leur régulation : cytochromes et isocytochromes. - Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les Microorganismes. Coll. Intern. C.N.R.S. 124, Ed. C.N.R.S. Paris.
- SMITH, H. 1923. On the apical growth of fungal hyphae. - Ann. Botany 37 : 341-343.
- STIER, T.J.B. and STANNARD, J.N. 1936. A kinetic analysis of the endogenous Respiration of bakers'Yeast. - J. Gen. Physiol. 19 : 461-477.
- STIER, T.J.B. and STANNARD, J.N. 1936. The metabolic systems involved in Dissimilation of Carbohydrate reserves in bakers'Yeast. - J. Gen. Physiol. 19 : 479-494.
- SUGIHARA, T.F. and HUMFELD, H. 1954. Submerged Culture of the Mycelium of Various Species of Mushroom. - Appl. Microbiol. 3 : 170-172.
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. and STAUFFER, J.F. 1957. Manometric Techniques. - Burgess Publ. Co., Minneapolis, Third Ed.
- WICKERHAM, L.J. 1951. Taxonomy of yeasts. - U.S. Dept. Agr. Washington D.C. Techn. Bull. 1029 : 1-56.

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction	1
Chapitre I - Matériel et techniques	3
Chapitre II - Recherches sur la croissance	
Introduction	11
Etude quantitative de la croissance en aérobiose	16
Croissance à basse pression d'oxygène et en anaérobiose	25
Facteur responsable des modifications morphologiques résultant d'une croissance en milieu submergé	30
Résumé du chapitre II	38
Chapitre III - Métabolisme anaérobie du glucose	
Introduction	39
Observation et mesure d'un dégagement de CO ₂ d'origine fermentaire chez quelques espèces	41
Mise en évidence et étude de la fermentation alcoolique de <u>Phlebia radiata</u> et de <u>Corticium ochraceo-fulvum</u>	45
Résumé du chapitre III	50
Chapitre IV - Métabolisme aérobie du glucose. Etude des échanges gazeux	
Introduction	51
Mesure et variations de l'intensité des échanges gazeux	53
Mise en évidence d'un phénomène d'adaptation respiratoire	80
Résumé du chapitre IV	87

Chapitre V - Métabolisme endogène

Introduction	89
Respiration endogène	91
Fermentation endogène	92
Variation du rapport des volumes gazeux échangés au cours de la consommation des réserves. Evaluation du Q.R.	97
Résumé du chapitre V	99
Conclusions	101
Bibliographie	107
